



Departamento de Bioquímica y Biotecnología Molecular

Programa de doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Ángela Coello Perles

Dr. Marcos Meseguer Escrivá

Valencia, 2019

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en las instalaciones del Instituto
Valenciano de Infertilidad, IVI Valencia



Dra. D^a. Ana Cristina Cobo Cabal, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que Doña Ángela Coello Perles ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Efecto de la vitrificación de ovocitos y embriones en el desarrollo embrionario y resultados clínicos: análisis morfocinético mediante la tecnología *time-lapse*”.

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa pública.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, mayo de 2019

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ana Cobo Cabal', with a large, stylized initial 'A' and 'C'.

FDO. Dra. D^a. Ana Cristina Cobo Cabal

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá, Doctor en Biología por la Universidad de Valencia

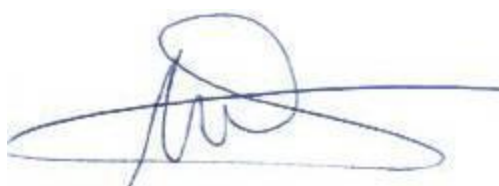
INFORMA:

Que Doña Ángela Coello Perles ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Efecto de la vitrificación de ovocitos y embriones en el desarrollo embrionario y resultados clínicos: análisis morfocinético mediante la tecnología *time-lapse*”.

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa pública.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

Valencia, mayo de 2019



FDO. Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

A mon pare, allà on estiga

*Fe no és esperar,
Fe no és somniar.
Fe és penosa lluita per l'avui i pel demà.
Fe és un cop de falç,
Fe és donar la mà.
La fe no és viure d'un record passat.*

*No esperem el blat
Sense haver sembrat,
No esperem que l'arbre doni fruits sense podar-lo;
L'hem de treballar,
L'hem d'anar a regar,
Encara que l'ossada ens faci mal.*

*No somniem passats
Que el vent s'ha emportat.
Una flor d'avui es marceix just a l'endemà.
Cal que neixin flors a cada instant.*

Lluís Llach "Cal que neixin flors a cada instant"

Contenido

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Vitricación de ovocitos y embriones	3
1.1 Antecedentes históricos.....	4
1.2. Principios generales de criopreservación	7
1.2.1. Congelación lenta vs. vitricación	8
1.2.2. Agentes crioprotectores	10
1.3. Desarrollo del protocolo de vitricación actual.....	12
1.4. Contribución de la vitricación a la práctica clínica.....	16
1.4.1. Vitricación de ovocitos	16
1.4.2. Vitricación de embriones	20
1.5. Daños de la vitricación sobre los ovocitos y embriones	22
2. Morfocinética y tecnología <i>time-lapse</i>	26
2.1. La importancia de la selección embrionaria	27
2.1.1. Evaluación morfológica vs. morfocinética.....	28
2.2. Características de los sistemas <i>time-lapse</i>	30
2.2.1. Ventajas e inconvenientes de los sistemas <i>time-lapse</i>	31
2.3. El ciclo celular y el desarrollo embrionario	32
2.4. Morfocinética embrionaria	36
2.4.1. Marcadores morfocinéticos	36
2.4.2. Identificación de marcadores morfocinéticos con relevancia clínica	38
II. OBJETIVOS	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Selección de las donantes	51
1.1. Estimulación ovárica de las donantes.....	51
2. Receptoras.....	52
2.1. Preparación endometrial de las receptoras	52

3. Punción ovárica, recuperación de ovocitos y decumulación	53
4. Vitrificación y desvitrificación	53
4.1. El método Cryotop®	54
4.2. Equipos y materiales.....	54
4.3. Soluciones	55
4.4. Procedimiento	55
4.4.1. Procedimiento de vitrificación	55
4.4.2. Procedimiento de desvitrificación.....	58
4.5. Almacenaje	59
4.6. Evaluación de la supervivencia	60
5. Obtención y procesamiento de las muestras de semen	60
6. ICSI.....	61
7. Sistema de análisis de imagen.....	62
7.1. Preparación de placas: EmbryoSlides®	62
7.2. Software integrado en el Embryoscope®: El EmbryoViewer	63
8. Transferencia embrionaria y determinación de la gestación.....	64
9. Estudio I: Impacto de la vitrificación de ovocitos en la cinética embrionaria.....	65
9.1. Diseño experimental.....	65
9.2. Parámetros morfocinéticos y variables analizadas.....	67
9.3. Categorías morfocinéticas	68
9.4. Análisis estadístico	69
10. Estudio II. Análisis de la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados	70
10.1. Diseño experimental.....	70
10.2. Parámetros morfocinéticos y variables analizadas.....	72
10.3. Evaluación de la morfología pre-vitrificación	73
10.4. Análisis estadístico	75
IV. RESULTADOS.....	77
Estudio I. Impacto de la vitrificación de ovocitos en la cinética embrionaria	79

1. Características demográficas de las donantes y receptoras	79
2. Cinética del desarrollo en función del origen de los ovocitos.....	80
3. Distribución de los embriones según los rangos óptimos definidos para las variables incluidas en el modelo	81
4. Clasificación embrionaria de acuerdo con el modelo jerárquico de selección	83
5. Resultados clínicos según día de transferencia en cada grupo.....	83
6. Tasa de implantación según cada categoría morfocinética	85
Estudio II: Análisis de la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados	86
1. Fase 1. Valores de los parámetros analizados y su relación con la tasa de implantación evolutiva.....	86
1.1.Evaluación de la re-expansión embrionaria	92
1.2. Evaluación del colapso embrionario	95
1.3. Distribución embrionaria según la evaluación morfológica pre-vitrificación.....	95
2. Fase 2: Generación del algoritmo de implantación	96
2.1.Distribución embrionaria en función de las categorías del modelo.....	96
2.2. Análisis de factores de confusión	98
3. Fase 3. Validación del modelo	99
3.1.Tasa de implantación evolutiva según cada categoría	99
V. DISCUSIÓN	101
Estudio I. Impacto de la vitrificación de ovocitos en la cinética embrionaria.....	103
Estudio II. Análisis de la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados	111
VI. CONCLUSIONES	119
VII. BIBLIOGRAFÍA	125
VIII. ANEXOS	147

ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

- Figura 1.** Distribución de las transferencias de embriones realizadas en España según datos del registro de la SEF.
- Figura 2.** Flujo de agua durante la criopreservación celular.
- Figura 3.** Efecto de la velocidad de enfriamiento en la supervivencia en cuatro tipos celulares.
- Figura 4.** Probabilidad de nucleación y vitrificación en función de la concentración de ACPs y temperatura.
- Figura 5.** Cambios de volumen de un ovocito durante el proceso de equilibrio con los ACPs.
- Figura 6.** Fotomicrografía del huso meiótico y organización y alineación cromosómica en ovocitos maduros después de vitrificación y calentamiento.
- Figura 7.** Evolución de la política de criotransferencias embrionarias. SEF 2000-2016.
- Figura 8.** Resumen de los principales sistemas *time-lapse* aplicados a la RA.
- Figura 9.** Fases del ciclo celular.
- Figura 10.** Fases de la mitosis.
- Figura 11.** Primeras etapas del desarrollo embrionario (del ovocito al estadio de morula).
- Figura 12.** Desarrollo del blastocisto.
- Figura 13.** Resumen de los marcadores de predicción de llegada a blastocisto según diferentes autores.
- Figura 14.** Resumen de los marcadores de predicción de implantación según diferentes autores.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 15.** Cryotop®.
- Figura 16.** Soluciones y material distribuido por Kitazato-Dibimed.
- Figura 17.** Placa Reproplate.
- Figura 18.** Proceso de equilibrado para la vitrificación de ovocitos.
- Figura 19.** Proceso de equilibrado para la vitrificación de blastocistos.
- Figura 20.** Lavados durante el paso por la solución VS.
- Figura 21.** Procedimiento de carga en el Cryotop®.
- Figura 22.** Almacenaje en tanques criogénicos.
- Figura 23.** EmbryoScope®.
- Figura 24.** Placas Embryoslide.
- Figura 25.** Preparación de placas Embryoslide.

- Figura 26.** Panel de división celular del Embryoviewer.
- Figura 27.** Distribución de ovocitos de los dos grupos de estudio.
- Figura 28.** Desarrollo del estudio de cohortes.
- Figura 29.** Parámetros morfocinéticos directos analizados.
- Figura 30.** Modelo de selección morfocinético propuesto por Meseguer y col.
- Figura 31.** Fases del estudio.
- Figura 32.** Parámetros analizados.
- Figura 33.** Esquema de la clasificación ASEBIR para blastocistos.

IV. RESULTADOS

- Figura 34.** Evaluación de la supervivencia.
- Figura 35.** Representación de los valores de los parámetros morfocinéticos según el origen ovocitario.
- Figura 36.** Distribución de los embriones en los rangos óptimos definidos.
- Figura 37.** Desarrollo embrionario en el grupo de ovocitos vitrificados.
- Figura 38.** Tasa de implantación según cada categoría morfocinética.
- Figura 39.** Blastocistos que no sobrevivieron al proceso de vitrificación.
- Figura 40.** Distribución de los embriones según cada uno de los parámetros analizados.
- Figura 41.** Proceso de re-expansión.
- Figura 42.** Tasa de implantación según el rango óptimo del grosor de la ZP inicial.
- Figura 43.** Tasa de implantación según el rango óptimo del grosor del área inicial.
- Figura 44.** Tasa de implantación según el rango óptimo del grosor de la ZP final.
- Figura 45.** Tasa de implantación según el rango óptimo del grosor del área final.
- Figura 46.** Distribución de los blastocistos según su capacidad de iniciar la re-expansión.
- Figura 47.** Tasa de implantación según su capacidad de iniciar la re-expansión.
- Figura 48.** Distribución de embriones según calidad embrionaria pre-vitrificación.
- Figura 49.** Distribución de embriones según grado de expansión pre-vitrificación.
- Figura 50.** Blastocistos que no iniciaron re-expansión durante el cultivo.
- Figura 51.** Estudio del colapso embrionario.
- Figura 52.** Distribución de embriones según calidad embrionaria pre-vitrificación.
- Figura 53.** Curva ROC.
- Figura 54.** Comparación del modelo original con la validación.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Estudios publicados que comparan los sistemas abiertos y cerrados de vitrificación en ovocitos.
Tabla 2.	Parámetros morfocinéticos.
Tabla 3.	Características demográficas de donantes y receptoras
Tabla 4.	Valores de cada uno de los parámetros morfocinéticos según el origen ovocitario.
Tabla 5.	Clasificación embrionaria según el modelo de árbol jerárquico
Tabla 6.	Resultados clínicos según el día de la transferencia embrionaria
Tabla 7.	Valores medios de los parámetros analizados para los embriones que implantan y los que no implantan
Tabla 8.	Valores exactos de los parámetros analizados según los cuartiles (Q1, Q2, Q3 y Q4) y tasa de implantación de los blastocistos KID.
Tabla 9.	Regresión logística para el análisis de la implantación según el grado de expansión.
Tabla 10.	Tasa de implantación según la clasificación morfológica pre-vitrificación.
Tabla 11.	Distribución de los blastocistos según el modelo de clasificación.
Tabla 12.	Análisis por regresión logística teniendo en cuenta posibles factores de confusión.
Tabla 13.	Distribución de los blastocistos según el modelo de clasificación.

ABREVIATURAS

ACP	Agentes crioprotectores
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
ASRM	Sociedad Americana de Medicina Reproductiva
AUC	Área bajo la curva
β -hCG	Hormona gonadotrofina coriónica humana
CP	Corpusculo polar
DMSO	Dimetilsulfóxido
E2	Estradiol
EOC	Estimulación ovárica controlada
EG	Etilenglicol
ESHRE	Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología
FIV	Fecundación <i>in-vitro</i>
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HPC	Hidroxipropilcelulosa
ICSI	Inyección intracitoplasmática
IMC	Índice de masa corporal
KID	Datos de implantación conocida
LH	Hormona luteinizante
MII	Metafase II
MCI	Masa celular interna
NL	Nitrógeno líquido
OMS	Organización Mundial de la Salud
PROH	Propanodiol
PVP	Polivinilpirrolidona
RA	Reproducción asistida
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RNV	Recién nacido vivo
SEF	Sociedad Española de la Fertilidad
TE	Trofoectodermo
Tg	Temperatura de transición a fase vítrea
ZP	Zona pelúcida

I. INTRODUCCIÓN

1. Vitrificación de ovocitos y embriones

La criopreservación de ovocitos y embriones mediante la técnica de vitrificación ha representado un gran avance en el campo de la RA. La posibilidad de criopreservar y almacenar ovocitos y embriones con éxito ha permitido su aplicación en la práctica diaria, convirtiéndose en una estrategia segura y eficaz para su uso en diferentes indicaciones clínicas.

Según los datos de los registros anuales de la SEF (Registro SEF), las transferencias de embriones criopreservados se han ido incrementando cada año, llegando a alcanzar en 2016, último registro publicado, casi el 50% del total de las transferencias realizadas (Figura 1). Esto ha supuesto que, ese mismo año, la cifra de nacimientos procedentes de un embrión previamente criopreservado ascendiera hasta 11416, siendo la más alta registrada hasta ese momento en España.

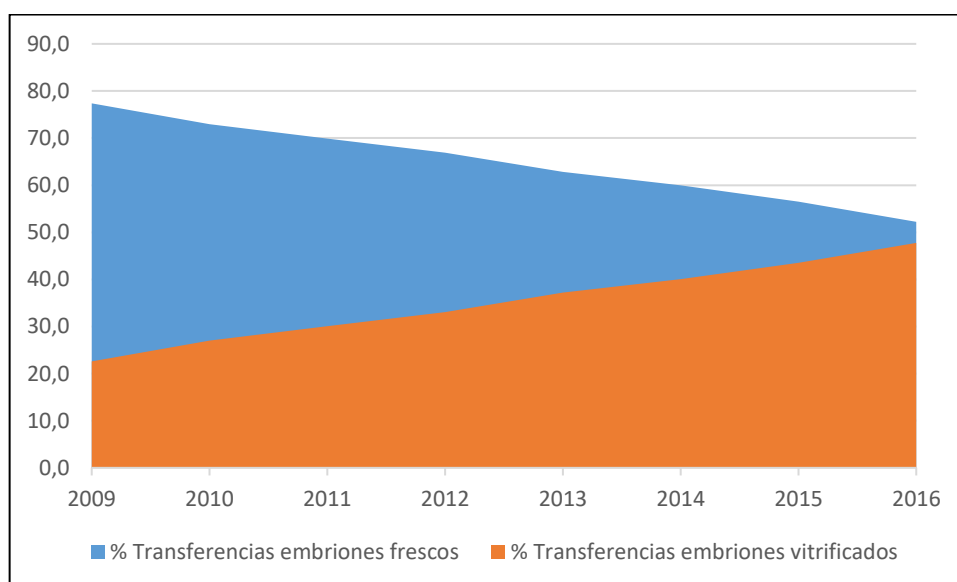


Figura 1. Distribución de las transferencias de embriones realizadas en España según datos del registro de la SEF.

A su vez, la vitrificación de ovocitos se ha incrementado de forma muy rápida en los últimos diez años. Durante mucho tiempo, la criopreservación del gameto femenino no fue considerada una opción real en la práctica clínica ya que, debido a su extrema sensibilidad y fragilidad, los intentos por conseguir un protocolo eficaz acababan en fracaso. Esta situación cambió a partir de la aparición de la vitrificación (Rall and Fahy, 1985) y los protocolos aplicados a su uso en ovocitos (Kuwayama *et al.*, 2005b). Además, el hecho de que numerosas publicaciones la avalasen como una técnica segura y eficaz (Cobo *et al.*, 2010a, Rienzi *et al.*, 2010, Smith *et al.*, 2010, Parmegiani *et al.*, 2011, De Munck and Vajta, 2017), llevó a la ASRM y

ESHRE, asociaciones profesionales del campo de la medicina reproductiva, a dejar de considerarla como una técnica experimental (ESHRE Task Force on Ethics and Law *et al.*, 2012, Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology, 2013). En 2016, 2699 niños nacieron en España procedentes de un ovocito previamente vitrificado (Registro SEF), confirmando su eficacia para la criopreservación del gameto femenino.

El reto más importante de la criobiología de gametos y embriones ha sido el desarrollo de un método eficiente de criopreservación que garantizara altas tasas de supervivencia y resultados clínicos satisfactorios. En la actualidad, se ha alcanzado esta meta puesto que disponemos de protocolos de vitrificación capaces de proporcionar una eficiencia similar a la conseguida con los ovocitos frescos (Cobo *et al.*, 2010a, Rienzi *et al.*, 2010); además de conseguir excelentes resultados con embriones en diferentes estadios de desarrollo (Cobo *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de estos buenos resultados, los efectos biológicos de preservar células a bajas temperaturas son complejos y todavía desconocidos en muchos aspectos.

1.1 Antecedentes históricos

Se entiende por criopreservación el uso de bajas temperaturas con el fin de preservar células y tejidos vivos estructuralmente intactos. Generalmente, para su almacenamiento a largo plazo, se utilizan temperaturas de NL. En este nivel, la actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas, quedan efectivamente detenidas. Sin embargo, la mayoría de las células sufren un considerable daño morfológico y funcional cuando se exponen a bajas temperaturas, a menos que previamente hayan sido expuestas a una solución con ACPs.

La clave para la supervivencia a temperaturas bajo cero radica en el destino del agua intracelular, ligada a la capacidad de respuesta osmótica de las células (MAZUR, 1963). A medida que desciende la temperatura, el agua cristaliza para formar hielo, primero en el espacio extracelular, y más tarde en el intracelular, provocando un daño físico en la integridad estructural de las células. Por otro lado, debido a la formación de hielo extracelular, se crea un gradiente de potencial químico que favorece la deshidratación de las células, aumentando por tanto la concentración de los solutos disueltos en la fase líquida restante, con el consiguiente aumento de su toxicidad (MAZUR, 1965). De este modo, la clave para la criopreservación exitosa de cualquier célula es evitar el hielo intracelular y los efectos secundarios de la cristalización extracelular.

Esta premisa ya fue sugerida por Luyet en 1937 (Luyet, 1937), quien señaló la importancia de la ausencia de hielo para la viabilidad de las células criopreservadas. Además, concluyó que el único método para vitrificar una célula y garantizar buenos resultados, es enfriarla rápidamente para omitir la zona de temperaturas de cristalización. Un año más tarde, Luyet publicó la vitrificación con éxito de espermatozoides de rana utilizando pequeñas gotas de semen en una disolución de sacarosa (Luyet B, 1938). Sin embargo, la vitrificación no fue aceptada completamente como una estrategia práctica para la criopreservación hasta muchos años después. Los principales motivos fueron la difícil reproducción de los resultados y la quimio-toxicidad asociada a la alta concentración de ACPs necesarios para desarrollar la técnica.

En 1949, se produjo un acontecimiento que dio un gran impulso a la criobiología. Polge y colaboradores (POLGE *et al.*, 1949), tratando de criopreservar espermatozoides de ave de corral, descubrieron por casualidad los efectos crioprotectores del glicerol. Se había abierto el paso a la congelación lenta (Arav, 2014).

Desde entonces, se han desarrollado múltiples protocolos de criopreservación de gametos y embriones con la finalidad de obtener mejores resultados. En 1972, se publicó por primera vez la supervivencia de embriones criopreservados haciendo uso de tasas lentas de enfriamiento y calentamiento en presencia de DMSO (Whittingham *et al.*, 1972).

En los años siguientes, gametos de diferentes especies fueron criopreservados con éxito, incluyendo ganado (Wilmut and Rowson, 1973), conejos (Bank and Maurer, 1974), ratas (Whittingham, 1975), ovejas (Willadsen *et al.*, 1974), cabras (Moore and Bilton, 1977) y caballos (Yamamoto *et al.*, 1982). Poco después, se publicó en la revista Nature el primer embarazo tras la transferencia de un embrión humano criopreservado (Trounson and Mohr, 1983), aunque por un problema obstétrico este no llegó a término. Habría que esperar un año más para obtener el primer RNV proveniente de un embrión humano criopreservado (Zeilmaker *et al.*, 1984).

Por aquél entonces, la técnica de criopreservación lenta se había estandarizado, proporcionando un éxito razonable en la mayoría de laboratorios para embriones de diferentes especies. Sin embargo, los investigadores, alentados por conseguir mejores resultados, empezaron a desarrollar nuevos protocolos de criopreservación rápida y ultrarrápida. En consecuencia, en 1985 se consiguió el nacimiento de ratones después de la transferencia de embriones vitrificados (Rall and Fahy, 1985). Este éxito condujo a la

reactivación de la vitrificación como una estrategia para la criopreservación ultrarrápida, aplicándose por primera vez en humanos en 1998 (Mukaida *et al.*, 1998).

La historia de la criopreservación del gameto femenino es mucho menos extensa que la embrionaria, repleta de fracasos y resultados no siempre reproducibles. En la década de 1950, con la constatación de que el glicerol podía servir como un ACP (POLGE *et al.*, 1949), varios investigadores lo usaron para criopreservar ovocitos de diferentes especies (Moore and Bilton, 1973, SHERMAN and LIN, 1959), pero ninguno de ellos tuvo éxito. El primer éxito en ovocitos humanos se lo debemos a Chen (Chen, 1986), quien publicó el nacimiento de gemelos provenientes de ovocitos criopreservados por congelación lenta. Sin embargo, el júbilo por este acontecimiento fue efímero ya que el éxito conseguido fue difícilmente reproducido por otros investigadores. Hasta 2004, alrededor de 100 bebés habían nacido a partir ovocitos criopreservados, pero las tasas de embarazo eran inaceptablemente bajas (1-5%) (Stachecki and Cohen, 2004, Oktay *et al.*, 2006). Entre las razones que explicaban estos resultados tan limitados estaban las bajas tasas de supervivencia (25-40%), la baja fecundación, una alta incidencia de poliploidía y una pobre capacidad de desarrollo embrionario (Tao and Del Valle, 2008). Trece años más tarde del acontecimiento logrado por Chen, se publicó el primer nacimiento tras la vitrificación de ovocitos usando EG y sacarosa como ACPs (Kuleshova *et al.*, 1999). A partir de ese momento, numerosos investigadores estudiaron la criopreservación ovocitaria por medio de la vitrificación, convirtiéndose hoy en día, en la técnica de elección para criopreservar ovocitos.

Las múltiples dificultades presentadas desde los inicios de la criopreservación ovocitaria están relacionadas con la propia estructura del ovocito y la alta sensibilidad que presenta a las bajas temperaturas. El ovocito es la célula más grande del cuerpo humano (alrededor de 150 μm de diámetro) (Sathananthan, 1997), con un gran contenido en agua, de forma esférica y con una baja relación superficie-volumen. Estas características podrían explicar en parte su gran susceptibilidad a la formación de hielo, así como la posible alteración en la distribución uniforme de ACPs. Además, su membrana plasmática tiene un bajo coeficiente de permeabilidad (Ruffing *et al.*, 1993, Van den Abbeel *et al.*, 2007), haciendo que el intercambio de agua y ACPs sea más lento. Esta susceptibilidad a las bajas temperaturas del ovocito detenido en MII se manifiesta en daños en sus diferentes estructuras: exocitosis prematura de los gránulos corticales y, por tanto, endurecimiento de la ZP (Johnson *et al.*, 1988); desorganización del citoesqueleto (Dobrinsky *et al.*, 2000), con posibles implicaciones para la activación del genoma embrionario (Yurttas *et al.*, 2008); o despolimerización del huso meiótico (Pickering *et al.*, 1990b). Además, considerando el ovocito como una célula única,

tiene solo una posibilidad de éxito, y hay pocas opciones de restaurar un daño grave, ya que no solo debe mantener la viabilidad celular, sino preservar su capacidad de fecundación y desarrollo.

1.2. Principios generales de criopreservación

Durante el proceso de criopreservación, las membranas biológicas se comportan como membranas semipermeables. Por tanto, según el principio de osmosis, el agua fluirá desde la fracción menos concentrada a la más concentrada con tal de igualar ambas concentraciones.

En general, cuando se enfría una célula por debajo de 0° C, empieza a formarse hielo en el medio extracelular y los cristales excluyen de su estructura a los solutos, que se concentran en el líquido aún no congelado, creando así una diferencia de potencial al lado externo de la membrana (Mazur, 1984). Para restablecer el equilibrio, se inicia un proceso de deshidratación celular en el que el agua difunde desde el interior de la célula hacia el exterior, de potencial químico más bajo (Figura 2). El flujo de agua a través de la membrana está limitado por la magnitud del gradiente osmótico y por las propiedades de permeabilidad de la misma. Mientras tanto, el contenido intracelular permanece sin congelar, súper enfriado y osmóticamente perdiendo agua para restablecer el equilibrio ante la solución hipertónica en la que se encuentra.

Durante el proceso de enfriamiento, las células están expuestas a concentraciones de soluto en aumento, cambios de pH y reducción de volumen. El estrés osmótico y exceso de deshidratación que sufren puede dañarlas mediante dos mecanismos distintos. Uno de ellos es debido al aumento de la concentración de sales derivada de la congelación extracelular, especialmente de electrolitos, tóxicos para la célula. Lovelock (LOVELOCK, 1954) señaló en la década de 1950 que son precisamente estos electrolitos los responsables de los daños en diferentes estructuras celulares como las mitocondrias y el citoplasma, pero especialmente, en la membrana celular que vería afectado su potencial químico, lo que trae consigo numerosos cambios que resultarían letales para la célula. El otro sería como consecuencia del estrés que sufre la membrana plasmática durante la deshidratación y posterior re-hidratación celular (Meryman, 1970). Esta situación es especialmente dramática para los ovocitos, ya que su volumen es mayor que el de otros tipos celulares. A medida que la célula pierde volumen por la pérdida de agua, la compresión del contenido citoplasmático aumenta la resistencia de la célula a seguir perdiendo volumen, y al excederse la resistencia física de la membrana se producen cambios irreversibles en su permeabilidad.

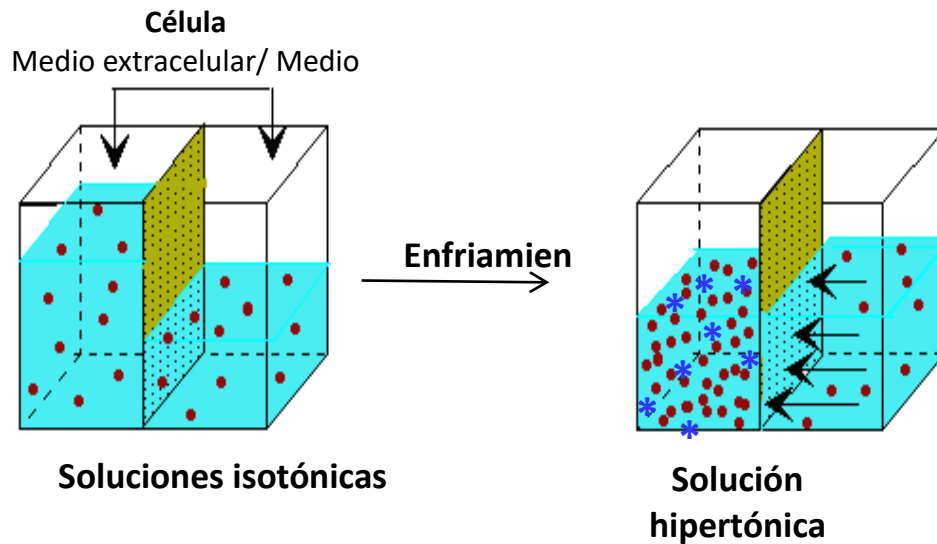


Figura 2. Flujo de agua durante la criopreservación celular. Tras el enfriamiento, el medio externo empieza a congelarse y, por lo tanto, se vuelve hipertónico. Como consecuencia, con el fin de igualar las concentraciones de solutos intra y extracelular, la célula se deshidrata.

1.2.1. Congelación lenta vs. vitrificación

Existen dos estrategias principales en criopreservación: la congelación lenta y la vitrificación. Ambas están basadas en la incorporación de ACPs y en la optimización de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, con el fin de evitar en la medida de lo posible los diferentes fenómenos físicos y biológicos que puedan acarrear la muerte celular.

En la congelación lenta se utilizan ACPs a concentraciones relativamente bajas, y se aplican velocidades de enfriamiento extremadamente lentas. De esta forma, se permite el intercambio de agua entre los compartimentos intra y extracelular sin inducir efectos osmóticos graves (Vajta and Kuwayama, 2006).

Las células son enfriadas a una tasa que permite la suficiente deshidratación celular para evitar la formación de hielo intracelular. Si una célula se enfría a velocidades demasiado rápidas, la deshidratación podría ser insuficiente, formándose hielo intracelular que provocaría la lisis de la célula. Si, por el contrario, la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la célula podría deshidratarse en exceso, provocando su colapso además de los efectos adversos debidos a un aumento en la concentración de solutos.

Esta disyuntiva es conocida como hipótesis de los dos factores, propuesta por Mazur para explicar los mecanismos del daño celular relacionados con la congelación lenta (Mazur *et al.*, 1972). Los efectos osmóticos y la formación de hielo intracelular hacen que cada célula

muestre la máxima supervivencia a una velocidad de enfriamiento característica. La representación gráfica de la supervivencia a diferentes velocidades de enfriamiento muestra un comportamiento en forma de U invertida, característico en este tipo de representaciones (Figura 3). Por lo tanto, el éxito de la congelación lenta depende del equilibrio logrado entre la velocidad a la que el agua sale de las células y la velocidad a la que se convierte en hielo (Visintin *et al.*, 2002).

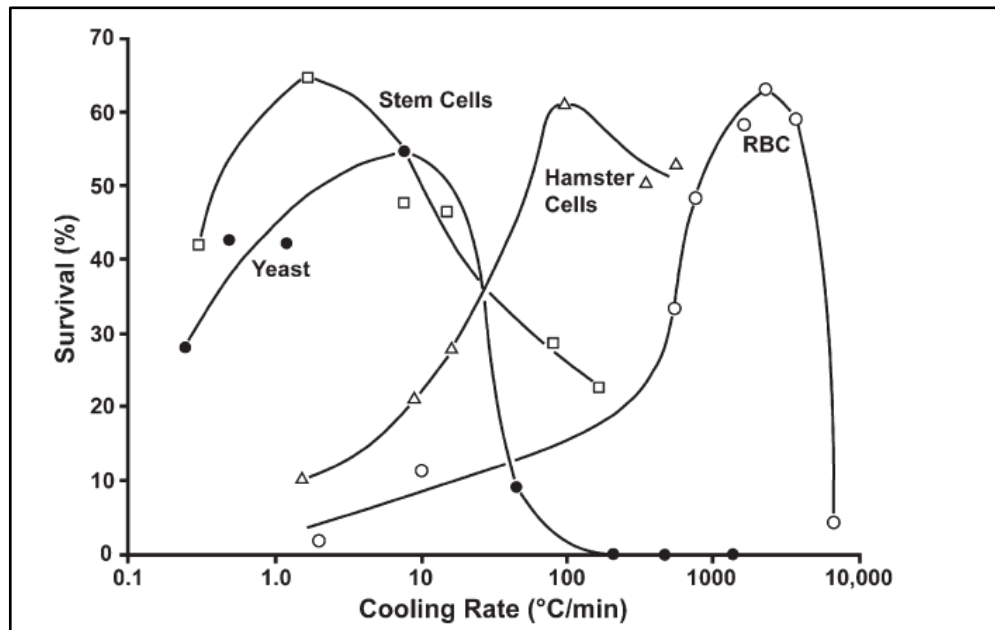


Figura 3. Efecto de la velocidad de enfriamiento en la supervivencia en cuatro tipos celulares.

Figura extraída de Mazur *et al.*, 1965.

La otra estrategia utilizada en criopreservación es la vitrificación. En contraste con la congelación lenta, la vitrificación se basa en la total eliminación de cristales de hielo en las soluciones tanto intra como extracelulares. De hecho, la vitrificación recibe su nombre del fenómeno físico que tiene lugar cuando una solución altamente concentrada en solutos se somete a bajas temperaturas empleando altísimas velocidades de enfriamiento. De esta forma, el citoplasma se torna altamente viscoso, hasta el punto que no cristaliza, sino que solidifica formando una estructura de características físicas similares al vidrio (Fahy *et al.*, 2004).

Durante el procedimiento, el agua es reemplazada en gran medida por los ACPs y el descenso de temperatura ocurre bruscamente desde temperatura ambiente hasta -196°C (15000 a 30000°C/min). De esta forma, se evitará la formación de cristales de hielo que pueden dañar las células o tejidos. La temperatura de transición a estado vítreo se sitúa

alrededor de los -130°C (Kasai and Mukaida, 2004), aunque puede variar dependiendo de los componentes de la solución de vitrificación. Desde el punto de vista técnico, la vitrificación es simple, rápida y no requiere un equipo adicional para su desarrollo.

A pesar de las ventajas que presenta, el principal inconveniente que plantea la vitrificación es el efecto tóxico que acarrea el uso de altas concentraciones de ACPs, requeridas para conseguir la viscosidad del citoplasma. Además, aunque por definición la vitrificación evita la formación de cristales de hielo, estos pueden llegar a formarse durante el calentamiento si no se utilizan velocidades muy rápidas. Este hecho ocurriría debido a que el estado vítreo en el que permanecen las células cuando son vitrificadas es termodinámicamente inestable y, por tanto, cuando estas se calientan, el medio puede convertirse en hielo cristalino (la forma termodinámicamente estable). La conversión puede tomar dos vías distintas denominadas devitrificación y recrystalización. La devitrificación ocurre a alrededor de -120°C (por encima de la T_g) y se define como la conversión de agua ultraviscosa en hielo cristalino. Los daños provocados en las células estarán relacionados con el tamaño de los cristales formados. La recrystalización, en cambio, ocurre a temperaturas más altas y da como resultado la conversión de un gran número de pequeños cristales de hielo relativamente inocuos en un número menor de cristales de hielo más grandes y dañinos (Seki and Mazur, 2008). En ambos casos, el calentamiento rápido es esencial para minimizar tanto la formación de cristales de hielo intracelular por devitrificación, como su crecimiento a tamaño letal por recrystalización.

1.2.2. Agentes crioprotectores

Los ACPs son sustancias hidrosolubles capaces de modificar las propiedades físico-químicas de las soluciones acuosas presentes en la materia viva. El papel de estas sustancias es proteger a las células de los efectos ocasionados por el hielo y la elevada concentración de sales.

Los ACPs se pueden clasificar en dos tipos en función de su capacidad de permear al interior de la célula: permeables y no permeables. Los ACPs permeables, debido a que tienen un peso molecular bajo, son capaces de atravesar la membrana plasmática de forma activa o pasiva. El grado de permeabilidad de una célula a un ACP dado dependerá de su coeficiente de permeabilidad, del gradiente de concentración, de la temperatura y de la relación superficie-volumen. Estas sustancias son muy hidrosolubles, rompen los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua y, a su vez, forman puentes de hidrógeno con el oxígeno. Entre las principales características que poseen destaca la reducción de la probabilidad de cristalización

al disminuirse el punto de congelación y eutéctico, dando más tiempo a la célula para que se deshidrate mientras se mantiene en equilibrio osmótico con el medio extracelular. Además, el reemplazo de las moléculas de agua por las de ACPs, disminuye la composición iónica de la fracción no congelada que como ya se sabe puede alcanzar niveles tóxicos.

Los más frecuentemente utilizados son el glicerol, EG, DMSO y PROH. De todos estos, el EG es el que menor toxicidad presenta (Kasai *et al.*, 1992) y el que más fácilmente difunde a través de la membrana plasmática (Emiliani *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la utilización de ACPs como el DMSO o el PROH produce efectos relevantes sobre el citoesqueleto, ya que altera el potencial químico del citoplasma desestabilizando el equilibrio entre la tubulina polimerizada y despolimerizada (Johnson and Pickering, 1987), aunque este suceso suele ser reversible tras la eliminación del ACP y retorno a 37°C (Van der Elst *et al.*, 1988). Estas observaciones han sido confirmadas en ovocitos humanos (Pickering *et al.*, 1990).

Los ACPs no permeables no tienen la capacidad de atravesar la membrana plasmática debido a que tienen una estructura compleja y un mayor peso molecular. Su función crioprotectora radica en la elevación de la presión osmótica extracelular favoreciendo así la deshidratación de la célula (Kasai *et al.*, 1990b) y previniendo, por tanto, la formación de hielo intracelular. Los hallazgos de varios estudios sugieren que estos también brindan su protección de dos formas distintas. Primero, estabilizando las membranas lipídicas y las proteínas como resultado de interacciones directas con residuos polares a través de enlaces de hidrógeno (la llamada hipótesis de reemplazo de agua) (Crowe *et al.*, 1984), y segundo, por sus excelentes propiedades formadoras de vidrio (Miller *et al.*, 1997). Dentro de este grupo se encuentran azúcares que pueden ser monosacáridos como la glucosa y otras hexosas o disacáridos como la sacarosa y trealosa. La sacarosa ha sido comúnmente utilizada como un ACP no permeable durante los protocolos de congelación lenta y vitrificación. En la actualidad está siendo sustituida por la trehalosa (Wright *et al.*, 2004) debido a las propiedades que tiene en la protección de las membranas celulares (Rudolph and Crowe, 1985), y a los resultados que demuestran su efectividad en la práctica clínica (Coello *et al.*, 2016). Estos solutos no permeables también juegan un papel fundamental en la dilución de los ACPs permeables tras la descongelación, ya que permiten la rehidratación gradual de las células evitando un choque osmótico.

Entre los ACPs no permeables también se engloban polímeros de alto peso molecular como la PVP, dextranos, albumina, hidroxietileno de almidón, eritritol, etc. Varios estudios avalan los efectos beneficiosos de estos compuestos (O'Neil *et al.*, 1997), ya que aumentan la viscosidad de la solución, permitiendo reducir la concentración de ACPs requeridos

(Liebermann and Tucker, 2002, Liebermann *et al.*, 2002). Se ha sugerido que dichos polímeros pueden generar una matriz viscosa que encapsularía los ovocitos y embriones ayudando a prevenir la cristalización (Kasai *et al.*, 1990a) y protegiendo las membranas durante el enfriamiento (Crowe *et al.*, 1983).

1.3. Desarrollo del protocolo de vitrificación actual

Durante los últimos años, han sido muchos los intentos de modificar el protocolo de vitrificación con el fin de optimizar los resultados en ovocitos y embriones humanos. Finalmente, el conocimiento de todas las variables implicadas y de los fenómenos que ocurren durante el proceso ha llevado a la consecución de los protocolos con los que contamos hoy en día.

Según mostró Saragusty (Saragusty and Arav, 2011), la probabilidad de vitrificación viene determinada por el delicado balance entre la velocidad de enfriamiento y calentamiento, la viscosidad (dependiente de la concentración de ACPs) y el volumen de la solución:

$$\text{PROBABILIDAD DE VITRIFICACIÓN} = \frac{\text{Velocidad de enfriamiento/calentamiento} * \text{Viscosidad}}{\text{Volumen}}$$

Por lo tanto, para conseguir una mayor probabilidad de vitrificación y, a su vez, reducir la toxicidad ligada a los ACPs, la estrategia más utilizada se centra tanto en el aumento de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, como en la reducción del volumen de la solución. A continuación, analizaremos cada una de estas variables y la relación que existe entre ellas.

- Velocidad de enfriamiento y calentamiento.

Las velocidades de enfriamiento y calentamiento son directamente proporcionales a la probabilidad de vitrificación. Una forma de aumentar la velocidad de enfriamiento es con el uso de N en estado sólido. Cuando las muestras se sumergen en NL se produce una ebullición del mismo que da como resultado la formación de burbujas de gas alrededor de la muestra, lo que puede producir una deficiente transferencia de temperatura. Aplicando una presión negativa sobre el NL, este congelará y se transformará en N sólido con una temperatura más baja (-210°C) y sin la típica ebullición ligada al uso de NL. Se han obtenido altas tasas de supervivencia ovocitaria y de embarazo clínico con la aplicación de este sistema (Yoon *et al.*, 2007). Sin embargo, su práctica no es habitual en los laboratorios de criopreservación.

Desde hace algunos años, se sabe que la velocidad de enfriamiento no es tan determinante del éxito del proceso, siempre y cuando se utilicen velocidades de calentamiento muy elevadas. Se llegó a esta premisa después de analizar el efecto de la velocidad de enfriamiento sobre la supervivencia ovocitaria a una velocidad de calentamiento dada y viceversa (Seki and Mazur, 2009). Los resultados mostraron que, si los ovocitos se desvitrificaban a velocidades muy altas, se obtenía una supervivencia mayor del 80% incluso con velocidades de enfriamiento bajas. Sin embargo, si se utilizaban velocidades de calentamiento muy bajas, la supervivencia era prácticamente nula, a pesar de utilizar velocidades de enfriamiento elevadas. Los autores interpretaron que la letalidad era consecuencia del calentamiento lento ya que, en esos casos, había tiempo suficiente para la formación de cristales por medio de la devitrificación y para que pequeños cristales intracelulares previamente formados crecieran por recrystalización.

- Viscosidad

La viscosidad del medio de vitrificación viene determinada por la concentración de ACPs y otros aditivos de las soluciones. De tal forma que, cuanto mayor es la concentración de estos, mayor será la viscosidad. La presencia de estos solutos disminuye el punto de congelación de la disolución, pero no es este el único cambio físico-químico que se produce ya que, el aumento de solutos también provoca un aumento de la T_g y por tanto una reducción de las probabilidades de formación de hielo. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de ACPs, el punto de congelación disminuirá, mientras que la T_g aumentará. De este modo, es posible encontrar el punto donde ocurra vitrificación con la menor cantidad de ACPs posible sin la formación de hielo (Figura 4).

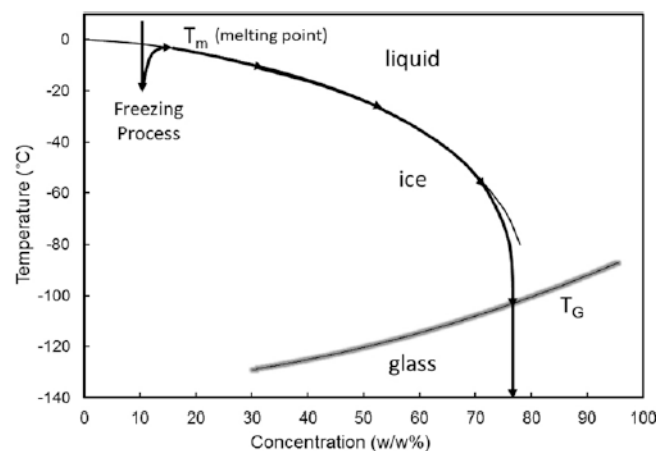


Figura 4. Probabilidad de nucleación y vitrificación en función de la concentración de ACPs y temperatura. Imagen extraída de Fahy *et al.*, 2004.

- Volumen de la solución

El volumen de la solución se relaciona inversamente con la probabilidad de vitrificación. Si tenemos en cuenta la ecuación formulada por Saragusty (Saragusty and Arav, 2011), observamos que, al reducir el volumen, las velocidades de enfriamiento y calentamiento se incrementan y, por tanto, la posibilidad de vitrificación aumenta. De esta forma, en la optimización del protocolo de vitrificación, la estrategia más utilizada es el uso de dispositivos de mínimo volumen, ya que permiten la reducción de ACPs conservando las probabilidades de vitrificación.

Este es el fundamento básico del método de vitrificación de mínimo volumen desarrollado por Arav (Arav *et al.*, 2002). Para llevarlo a cabo, las muestras deben cargarse en un dispositivo específico con un volumen mínimo (alrededor de 0,1 μL), y enfriarse rápidamente por inmersión en NL. Con este método se consiguen altas tasas de enfriamiento ya existe un contacto directo entre las muestras y el NL, motivo por el cual a estos dispositivos se les ha denominado sistemas abiertos de vitrificación. Durante los últimos años, se han desarrollado una gran variedad de estos sistemas entre los que se incluyen las rejilla de microscopía electrónica (Martino *et al.*, 1996), técnica de microgotas (Arav *et al.*, 1987), Cryotop® (Kuwayama *et al.*, 2005b), Cryoloop (Lane *et al.*, 1999), Hemi-paja (Vanderzwalm P, 2000), superficie sólida (Dinnyes *et al.*, 2000), malla de nylon (Matsumoto *et al.*, 2001), Cryoleaf (Wang *et al.*, 2012), vitrificación directa cubierta (Chen *et al.*, 2006), espátula de vitrificación (Tsang and Chow, 2009), Cryo-E (Petyim *et al.*, 2009), hoja de plástico (Sugiyama *et al.*, 2010) y Vitri-Inga (Almodin *et al.*, 2010b).

Uno de los más utilizados en los laboratorios de RA es el Cryotop® (Kitazato Supply Co., Fujinomiya, Japón) diseñado por M. Kuwayama (Kuwayama *et al.*, 2005b). Este dispositivo consiste en una fina tira transparente donde se cargan las muestras, unida a un mango plástico resistente al NL. Su diseño permite realizar la carga de las muestras con un volumen mínimo de medio de vitrificación (0,1 μL), proporcionando unas altas tasas de enfriamiento (23000°C/min) y calentamiento (42000°C/min). Este dispositivo se ha aplicado con éxito para criopreservar ovocitos y embriones humanos (Cobo *et al.*, 2008a, Cobo *et al.*, 2012).

Cobo y colaboradores (Cobo *et al.*, 2008b) publicaron un estudio cuyo objetivo era evaluar el impacto de la vitrificación con el método Cryotop® en ovocitos de donante, en cuanto a supervivencia y potencial de desarrollo comparado con ovocitos frescos. Para ello, una cohorte de ovocitos de una misma donante se dividió aleatoriamente en dos grupos: en el primero, los ovocitos fueron vitrificados y, en el segundo, los ovocitos restantes se

mantuvieron en el incubador (grupo control de ovocitos frescos). Al cabo de una hora tras la vitrificación, se procedió a la desvitrificación, y tras dos horas adicionales se procedió a la inseminación simultánea de los dos tipos de ovocitos, los frescos y los desvitrificados. El estudio incluyó 30 donantes y 30 receptoras (509 ovocitos; 231 vitrificados y 219 frescos). Tras obtener una supervivencia del 96,9%, no se encontraron diferencias en la tasa de división en día tres (77,6% en vitrificados vs. 84,6% en frescos) ni en la calidad morfológica de los embriones (80,8 vs 80,5% de embriones de buena calidad en vitrificados vs. frescos). Así mismo, tanto la tasa de blastocisto (48,7% vs. 47,5%) como su calidad (81,1% vs. 70%) fue similar al comparar ambos grupos.

El principal inconveniente de los dispositivos abiertos es el riesgo teórico de contaminación, ya sea a través de NL contaminado o por contagio con otras muestras durante el almacenaje. Esto podría solucionarse con el uso de NL estéril para la vitrificación (Parmegiani *et al.*, 2010) y tanques de vapor para el almacenamiento (Cobo *et al.*, 2010b). Obviamente, los sistemas de vitrificación cerrados representan una evidente solución para el riesgo de contaminación. En estos casos se requiere la carga de la muestra en dispositivos que son sellados antes de su inmersión en NL. Dentro de este grupo encontramos la pajuela de plástico Open Pulled Straw (Vajta *et al.*, 1997), Closed Pulled Straw (Chen *et al.*, 2001), flexipet-denuding pipeta (Liebermann *et al.*, 2002), CryoTip (Kuwayama *et al.*, 2005a), pipette tip (Sun *et al.*, 2008), dispositivo de vitrificación de alta seguridad (Camus *et al.*, 2006), sealed pulled straw (Yavin *et al.*, 2009), Rapid-i (Desai *et al.*, 2013), y safespeed (Gallardo *et al.*, 2016).

La principal limitación de los sistemas cerrados es que el aislamiento térmico de las muestras ralentiza la tasa de enfriamiento descendiendo hasta los 2000°C/min. Por lo tanto, para mantener altas las probabilidades de vitrificación, es necesario encontrar un equilibrio óptimo con la tasa de calentamiento y la concentración de ACPs. Esta puede ser una de las razones por las que siempre se han atribuido peores tasas de supervivencia a los sistemas cerrados. Diferentes grupos han intentado comparar ambos sistemas aplicados a la vitrificación de ovocitos (Paffoni *et al.*, 2011, Papatheodorou *et al.*, 2013, De Munck *et al.*, 2016). Mientras uno de ellos encontró resultados comparables entre ambos sistemas (De Munck *et al.*, 2016), otros dos grupos observaron una tasa de supervivencia significativamente más baja cuando se utilizaba un sistema cerrado (Paffoni *et al.*, 2011, Papatheodorou *et al.*, 2013) (Tabla 1). Tal vez, el descenso de las velocidades de enfriamiento y calentamiento afecte los ovocitos a nivel estructural, ya que se ha sugerido que los sistemas abiertos proporcionan una mejor conservación de su estructura nativa que los sistemas cerrados (Bonetti *et al.*, 2011).

Tabla 1. Estudios que comparan los sistemas abiertos y cerrados de vitrificación en ovocitos					
Autor	Diseño	Soporte	Nº ciclos vit (Nº ovocitos)	Nº ciclos desv (Nº ovocitos)	Supervivencia (%)
Paffoni et al., 2011	Cohortes	Cryotop®	53(268)	53(268)	82,8
		Cryotip	51(261)	51(261)	57,9
Papatheodorou et al., 2013	Aleatorizado	Vitrisafe	75 (608)	75 (608)	90,9
		Vitrisafe +HSS	75 (598)	75 (598)	82,9
De Munck et al., 2016	Aleatorizado	CBS	48 (253)	48 (253)	93,7
		Cryotop®	48 (257)	48 (257)	89,9

Ambos sistemas también se han comparado en el caso de embriones en estadio pronuclear y de 4 células (Kuwayama *et al.*, 2005a), así como en estadio de blastocisto (Hashimoto *et al.*, 2013, Desai *et al.*, 2013), no encontrándose diferencias significativas en la tasa de supervivencia, gestación o RNV.

1.4. Contribución de la vitrificación a la práctica clínica

1.4.1. Vitrificación de ovocitos

El potencial de la vitrificación de ovocitos en los laboratorios de FIV ha dado lugar a que numerosos grupos evalúen los resultados que esta técnica ofrece. El Anexo 1 muestra la relación de trabajos que han intentado comparar los resultados obtenidos usando ovocitos frescos y vitrificados. Aunque puede resultar complicado comparar todos ellos debido a las diferencias en los protocolos de vitrificación y el origen ovocitario, en general, se observan unos resultados similares entre ambos grupos de ovocitos. La vitrificación de ovocitos de donante ofrece una supervivencia de alrededor del 90% (entre 85,6%-96,9%) y parece no tener efectos negativos sobre la fecundación, desarrollo embrionario o gestación, comparada con los ciclos con ovocitos frescos. En el caso de ovocitos procedentes de pacientes infértiles, la vitrificación parece tener un impacto mayor en las tasas de supervivencia, que se sitúa alrededor del 88% (entre 79,6%-99,4%). Esto podría deberse a la peor calidad ovocitaria asociada a la edad de la paciente (Potdar *et al.*, 2014), que también se plasma cuando se comparan las tasas de gestación entre ovocitos vitrificados donados y propios (60% vs. 40% respectivamente).

Actualmente, son muchas las mujeres que se pueden beneficiar de la vitrificación de ovocitos. Las pacientes con cáncer que necesitan una opción para la preservación de la fertilidad antes de someterse a un tratamiento con quimio o radio terapia (Cobo *et al.*, 2008a), o las mujeres que desean retrasar su maternidad debido a diferentes razones sociales o personales (Dondorp and De Wert, 2009, Garcia-Velasco *et al.*, 2013) son algunas de ellas. Además, el almacenamiento de ovocitos durante un tiempo indefinido ofrece ventajas adicionales para diferentes estrategias de RA. En estos casos, la criopreservación ovocitaria ayuda a resolver diferentes situaciones clínicas como en pacientes con baja respuesta (Cobo *et al.*, 2012), ausencia de la muestra de semen de la pareja masculina, riesgo de sufrir síndrome de hiperestimulación ovárica (Herrero *et al.*, 2011), casos en los que existen restricciones legales para la vitrificación embrionaria (van Uem *et al.*, 1987) o algún caso en los que la transferencia de embriones no es aconsejable (Herrero *et al.*, 2014). Sin lugar a dudas, los programas de ovodonación también han sido los principales beneficiarios de la vitrificación, gracias a la creación de bancos de ovocitos (Cobo *et al.*, 2010a).

- **Programas de donación de ovocitos**

Los programas de donación de ovocitos permiten que embriones generados a partir de ovocitos provenientes de mujeres jóvenes y fértiles sean transferidos a otras mujeres con problemas para concebir. El éxito de los programas de donación de ovocitos requiere un endometrio receptivo, generalmente preparado con esteroides exógenos (Remohi *et al.*, 1995) y un reemplazo bien sincronizado de embriones de buena calidad.

En los últimos años, estos programas se han visto enormemente beneficiados gracias a la vitrificación y a la creación de bancos de ovocitos. Esta estrategia ha permitido eliminar algunos de los inconvenientes de las donaciones en fresco, como son la sincronización entre donantes y receptoras, las largas listas de espera en busca de donantes compatibles y la ausencia de un periodo de cuarentena. Además, otra ventaja considerable del banco de ovocitos es el poder contar con gametos que porten genes responsables de fenotipos variados, así como diferentes tipos sanguíneos etc.

El primer RNV tras la vitrificación del gameto femenino se obtuvo de un ovocito donado utilizando un sistema abierto (OPS) en 1999 (Kuleshova *et al.*, 1999). Desde entonces, numerosas publicaciones utilizando diferentes tipos de dispositivos corroboran la efectividad de la técnica.

En 2010 se publicó un estudio clínico prospectivo y aleatorizado cuyo objetivo era la validación de la vitrificación de ovocitos como herramienta fundamental en el funcionamiento

de los programas de ovodonación (Cobo *et al.*, 2010a). La tasa de supervivencia global en este estudio fue de 92,5% y la tasa de gestación evolutiva en el caso de las pacientes que recibieron ovocitos vitrificados de 43,7% frente al 41,7% obtenido después de la transferencia de embriones procedentes de ovocitos frescos. Este estudio confirmó las observaciones anteriores acerca de la no alteración del potencial de los ovocitos donados vitrificados para desarrollarse en embriones competentes, capaces de generar gestaciones evolutivas en una proporción similar a los ovocitos frescos

Recientemente, se ha publicado un estudio observacional en el que se describe la experiencia de 6 años con el banco de ovocitos en IVI (Cobo *et al.*, 2015). El análisis incluyó 3610 ciclos de ovodonación donde 42152 MII fueron desvitrificados con una tasa de supervivencia del 92,6%. El impacto del tiempo de almacenaje en la supervivencia ovocitaria y resultados clínicos fue analizado estableciendo diferentes intervalos de tiempo que comprendían desde periodos menores a 6 meses hasta mayores de 5 años. En ningún caso el tiempo de almacenaje afectó la supervivencia ni los resultados clínicos. Este hallazgo reviste gran importancia ya que el éxito después de un largo tiempo de almacenaje corrobora la sostenibilidad de la técnica.

La tasa de implantación, gestación clínica y evolutiva por ciclo de ovodonación fueron de 39,0%, 48,4% y 39,9% respectivamente, lo que confirma los resultados de los estudios previos. La tasa de parto por ciclo de donación fue del 39,1%. Este resultado se incrementó notablemente al incluir las sucesivas transferencias de embriones vitrificados, alcanzando más del 70% después de 3 criotransferencias y casi el 80% después de 5. Este resultado muestra la alta rentabilidad obtenida a partir de un solo ciclo de ovodonación, además de evidenciar como ya se hizo en estudios previos (Cobo *et al.*, 2013), la ausencia de efectos nocivos tras la doble vitrificación; es decir, los embriones vitrificados desarrollados a partir de ovocitos vitrificados.

- **Preservación de la fertilidad**

La vitrificación de ovocitos es actualmente una opción para las mujeres que desean preservar sus gametos con el fin de tener la oportunidad de concebir en el futuro con su propia descendencia genética (Cobo *et al.*, 2013). Las principales beneficiarias de esta estrategia son las pacientes con cáncer que deben someterse a quimioterapia o radioterapia y las pacientes con otras enfermedades que requieren tratamientos potencialmente gonadotóxicos.

El primer caso reportado en Europa de un embarazo después de PF usando vitrificación de ovocitos fue en un paciente cuya corteza ovárica fue criopreservada primero, y después del injerto, se realizaron cuatro ciclos de estimulación para acumular y vitrificar ovocitos maduros. Un ciclo posterior de FIV concluyó exitosamente en un embarazo gemelar (Sanchez-Serrano *et al.*, 2010). Desde entonces, varios grupos han publicado resultados clínicos con ovocitos vitrificados para PF en pacientes con cáncer (Anexo 2).

Aunque la PF inicialmente puede afectar a este grupo de pacientes, existen muchas otras condiciones médicas que pueden comprometer la fertilidad, como endometriosis o alto riesgo de fallo ovárico temprano, donde se requiere una intervención que proteja los gametos para un uso futuro. Además, la disminución de la fertilidad relacionada con la edad es una condición muy común en el campo de la RA, por lo que la vitrificación electiva de ovocitos para afecciones no médicas se acepta cada vez más como una opción para posponer la maternidad.

Recientemente, se ha publicado la experiencia de IVI en PF electiva en una población de mujeres que decidieron vitrificar sus gametos para su uso futuro (Cobo *et al.*, 2016). Se observó un efecto claro y esperado de la edad de la mujer, lográndose mejores resultados en mujeres de ≤ 35 años. En este grupo se recuperó y se vitrificó un mayor número de ovocitos, y la supervivencia y los resultados clínicos fueron equivalentes a los alcanzados en el programa de la donación de ovocitos. Además, se observó diferente probabilidad de tener un RNV de acuerdo con la cantidad de ovocitos consumidos cuando se compararon los grupos de ≤ 35 años y > 36 años ($P < .05$).

- ***Pacientes con baja respuesta a la estimulación ovárica***

Una posible alternativa para el manejo de la baja respuesta es acumular ovocitos vitrificados durante varios ciclos de estimulación con el fin de construir una cohorte más numerosa, e inseminarlos todos al mismo tiempo en un ciclo posterior. Teóricamente, esto podría ayudar a aumentar las posibilidades de éxito al otorgar a las pacientes un estado similar a las normorespondedoras. En 2012, un estudio se encargó de evaluar la eficiencia de esta nueva estrategia (Cobo *et al.*, 2012). Este incluyó 242 pacientes (594 ciclos) con baja respuesta cuyos ovocitos maduros se acumularon por vitrificación e inseminaron simultáneamente en un solo ciclo, y 482 pacientes (588 ciclos) con ovocitos frescos en todos los ciclos de estimulación. Con la estrategia de acumular ovocitos, se obtuvo una tasa acumulada de RNV por transferencia estadísticamente superior a la obtenida con los ciclos en fresco. Además, la cancelación de la transferencia de embriones por paciente fue significativamente menor en el grupo de ovocitos vitrificados que en el grupo de ovocitos frescos.

Otros autores también han estudiado la vitrificación de ovocitos en el contexto de pacientes infértiles. Rienzi y colaboradores (Rienzi *et al.*, 2010) realizaron un estudio de cohortes prospectivo y aleatorizado que incluía 120 ovocitos frescos y 124 vitrificados de 40 pacientes infértiles. La tasa de supervivencia fue del 97% y la tasa de fecundación tras ICSI de 79%. Además, también observaron que las proporciones de embriones de buena calidad eran similares en ambos grupos.

En otro estudio se calcularon las tasas de embarazo acumuladas tras sucesivas transferencias de embriones derivados de ovocitos frescos y vitrificados a partir de un solo ciclo de estimulación ovárica. Las tasas de implantación en los ciclos con ovocitos frescos y vitrificados no fueron significativamente diferentes para las mujeres ≤ 34 años (Ubaldi *et al.*, 2010). Sin embargo, otro estudio encontró menor número de células en los embriones en día 3 de cultivo cuando estos procedían de ovocitos vitrificados (Almodin *et al.*, 2010). De forma similar, Forman (Forman *et al.*, 2012) también observó una calidad embrionaria disminuida en los ciclos con ovocitos vitrificados con una tasa de embriones biopsiables menor en este grupo.

Estos estudios sugieren que la vitrificación de ovocitos también es una técnica eficiente aplicada en pacientes infértiles. Sin embargo, dado que algunos autores han encontrado un desarrollo más comprometido en embriones procedentes de ovocitos vitrificados, resulta interesante evaluar los efectos de la vitrificación en los tiempos de división embrionaria.

1.4.2. Vitrificación de embriones

Con la incorporación de la vitrificación a la práctica clínica como técnica para la criopreservación de embriones se ha abierto un abanico de nuevas posibilidades para su uso en diferentes estrategias. La vitrificación de embriones permite incrementar los resultados de gestación acumulada, ya que se pueden lograr varios embarazos después de un solo ciclo de estimulación ovárica, obteniendo, por tanto, el máximo rendimiento del tratamiento. Esto ha sido posible debido a las mejoras en los protocolos, que han reducido los daños potenciales que esta técnica podía causar sobre los embriones. Evidencia de ello son las numerosas publicaciones que la avalan como una técnica segura y eficaz para el uso embrionario, por encima de la congelación lenta (Balaban *et al.*, 2008, Loutradi *et al.*, 2008, Rienzi *et al.*, 2017). Sin lugar a duda, la vitrificación de embriones sobrantes es su uso más extendido, viéndose incrementada en los últimos años a raíz de la reducción legislativa de los embriones a transferir. En 2014, Cobo y colaboradores publicaron los resultados de una gran serie de transferencias de embriones vitrificados en todos los estadios del desarrollo, mostrando resultados similares de supervivencia e implantación (Cobo *et al.*, 2014).

Un metaanálisis reciente evaluó los resultados clínicos tras la vitrificación de embriones en estadio temprano ($n = 4594$) y en blastocisto ($n = 1996$), y no encontraron diferencias entre ambos grupos en cuanto a tasa de gestación, pero sí cuando la implantación fue analizada (Zeng *et al.*, 2018). Este metaanálisis mostró que la vitrificación en cualquier etapa del desarrollo embrionario no tenía un efecto perjudicial sobre el resultado clínico, aunque la vitrificación y transferencia en estadio de blastocisto se posicionaba como una opción favorable y prometedora en RA.

La posibilidad de vitrificar los embriones conservando intacta su capacidad de implantación ha dado pie a la introducción de una nueva estrategia, en la que todos los embriones de la cohorte son vitrificados para transferirlos en posteriores ciclos. El fundamento de esta práctica se basa en que, al realizar la transferencia en un ciclo en el que no ha habido estimulación ovárica, la receptividad endometrial no se ve afectada negativamente puesto que los embriones son transferidos en un entorno más fisiológico. De hecho, algunos autores han propuesto su uso extendido en la práctica clínica, debido a los mejores resultados obtenidos en comparación con las transferencias en fresco (Shapiro *et al.*, 2011, Roque *et al.*, 2015). Sin embargo, estos resultados no siempre han sido reproducibles, además de estar fuertemente condicionados por el resultado de la vitrificación.

A la espera de conclusiones más firmes para su uso de forma rutinaria, la estrategia de vitrificar todos los embriones resulta efectiva en algunos supuestos clínicos como es el caso de pacientes con riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica, una complicación iatrogénica grave que puede amenazar la vida de las pacientes sometidas a tratamientos de fertilidad (Asch *et al.*, 1991). También en casos de sangrado endometrial, niveles de progesterona sérica elevada el día de la inducción de la ovulación (Racca *et al.*, 2018) o a causa de cualquier otro evento no planificado.

Además, en los últimos años, con la introducción de la biopsia en estadio de blastocisto, la vitrificación embrionaria se ha visto estrechamente ligada a los programas de PGT (Schoolcraft *et al.*, 2010). Una vez realizada la biopsia, los blastocistos son vitrificados durante un tiempo indefinido a la espera de los resultados genéticos. Los datos reportados hasta el momento son positivos (Van Landuyt *et al.*, 2011, Chang *et al.*, 2013, Schoolcraft and Katz-Jaffe, 2013), e indican que la vitrificación de embriones cromosómicamente normales no afecta su potencial de implantación.

En ocasiones, debido a diversos motivos, es necesaria la criopreservación de embriones por segunda vez. Kumasako y colaboradores analizaron el resultado de embriones que requirieron una segunda vitrificación (Kumasako *et al.*, 2009), obteniendo tasas de implantación y de embarazo comparables a los embriones sometidos a una sola vitrificación. Estos datos han sido corroborados en posteriores estudios (Sills *et al.*, 2009, Zheng *et al.*, 2017).

1.5. Daños de la vitrificación sobre los ovocitos y embriones

Aunque la vitrificación de ovocitos y embriones parece ofrecer resultados similares a los obtenidos en ciclos en fresco (Cobo *et al.*, 2008b, Cobo *et al.*, 2010a, Rienzi *et al.*, 2010, Sole *et al.*, 2013), todavía se desconoce su impacto real sobre las diferentes estructuras celulares. Durante el proceso, los ovocitos y embriones se someten a diferentes condiciones que pueden llegar a afectar su integridad: exposición inicial a los ACPs, enfriamiento a temperaturas bajo cero, almacenamiento, calentamiento y, finalmente, dilución y eliminación de los ACPs con retorno a un ambiente fisiológico. La incidencia de los daños que podrían sufrir tanto el gameto femenino como los embriones en sus diferentes estadios, está estrechamente relacionada con las propiedades criobiológicas de los mismos, como son la sensibilidad al enfriamiento, la permeabilidad de la membrana plasmática al agua y a los ACPs, la sensibilidad a la toxicidad química de los ACPs y la tolerancia a los cambios de volumen por efectos osmóticos (Moussa *et al.*, 2014).

- Daños a nivel del citoesqueleto

El citoesqueleto de las células está formado por microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Durante la vitrificación, las células se exponen a soluciones de ACPs que causan cambios en su volumen y pueden llegar a dañar la integridad del citoesqueleto. La Figura 5 muestra los cambios de volumen de un ovocito durante el proceso de equilibrio con los ACPs.

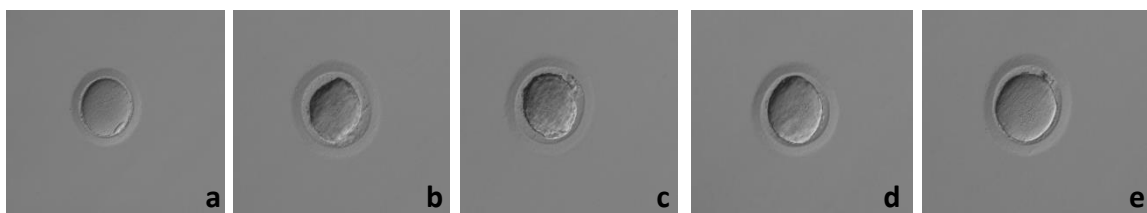


Figura 5. Cambios de volumen de un ovocito durante el proceso de equilibrio con los ACPs. a) t0; b) a los 1,5 min; c) a los 3 min; d) a los 6 min y e) a los 12 min.

Después de la criopreservación de ovocitos, se ha observado una organización anómala de los microfilamentos (Vincent et al., 1989). Estas perturbaciones estructurales pueden llevar a distribuciones anormales de mitocondrias en el oolemma (Nagai et al., 2006, Zander-Fox et al., 2013) y, eventualmente, a una reducción de la competencia ovocitaria.

La citoqueratina es un filamento intermedio que juega un papel importante en la maduración del ovocito y el desarrollo embrionario (Gallicano et al., 1991). Se ha visto que la estructura de este filamento se ve afectada durante la vitrificación de ovocitos maduros (Valojerdi and Salehnia, 2005) e inmaduros (Wei et al., 2013), y que muy probablemente contribuye a su supervivencia (Valojerdi and Salehnia, 2005).

- Daños a nivel del huso meiótico

En los ovocitos, los husos meióticos desempeñan papeles fundamentales tanto en la progresión meiótica como en la alineación y segregación cromosómica (Schatten *et al.*, 1985). Además, son cruciales para los eventos posteriores a la fecundación, como la finalización de la meiosis, la extrusión del segundo CP, la migración de los pronúcleos, y la formación del primer huso mitótico (Chen and Yang, 2009).

El huso meiótico en ovocitos de mamífero es sensible a la temperatura, y se sabe que se despolimeriza temporalmente a temperaturas inferiores de 37°C (Wang and Keefe, 2002). Aunque el uso de un ACP ayuda a estabilizar el huso durante el proceso de criopreservación, su extrema sensibilidad a la temperatura y a la deshidratación/rehidratación, puede comprometer la segregación cromosómica (Chen *et al.*, 2004, Bianchi *et al.*, 2005, Coticchio *et al.*, 2005). Coticchio, al evaluar el huso meiótico y la organización del cromosoma en ovocitos tras la vitrificación, observó que a pesar de que estos mantenían el huso con una organización bipolar, la alineación cromosómica parecía estar parcialmente comprometida (Coticchio *et al.*, 2009). Un estudio posterior que realizó el mismo análisis, confirmó la alineación cromosómica anómala en ovocitos vitrificados, sin embargo, en este caso el huso meiótico también presentó una conformación alterada (Jung and Cheon, 2014) (Figura 6).

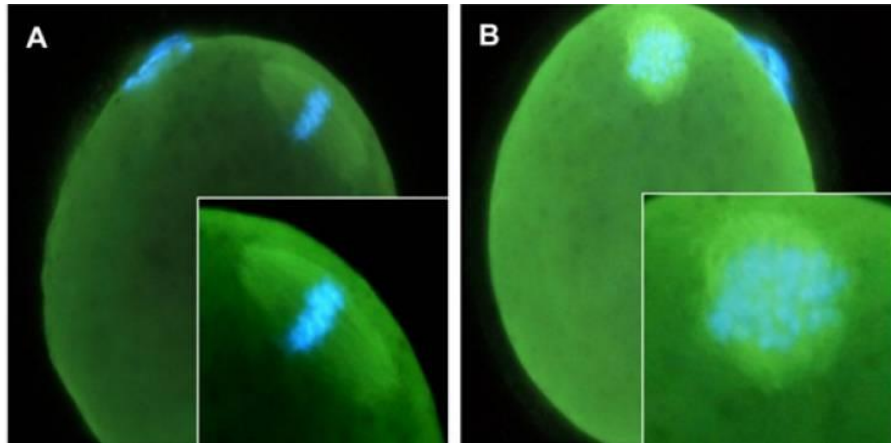


Figura 6. Fotomicrografía del huso meiótico y organización y alineación cromosómica en ovocitos maduros después de vitrificación y calentamiento. A) ovocito con huso meiótico normal y alineación cromosómica. B) ovocito con una organización anormal del huso meiótico y alineación cromosómica. Imagen extraída de Jung and Cheon, 2014.

Varios estudios demostraron que la desorganización o desaparición del huso se observaba en mayor grado tras la congelación lenta que con el procedimiento de vitrificación (Eroglu *et al.*, 1998, Chen *et al.*, 2000, Rienzi *et al.*, 2004). Sin embargo, en ambos casos, el huso reaparecía tras un periodo de incubación que dependía entre otras cosas, de la especie y de la técnica de criopreservación empleada (Ciotti *et al.*, 2009).

Una posible estrategia para evitar la despolimerización del huso, podría ser la vitrificación en estadio de vesícula germinal. Sin embargo, el hecho de que los ovocitos inmaduros son menos permeables al agua y a los ACPs (Agca *et al.*, 1998), y más sensibles a la criopreservación (Ghetler *et al.*, 2005), unido a la baja eficiencia en los protocolos de maduración *in vitro* (Escrich *et al.*, 2012) ha descartado esta opción para su uso en la práctica clínica.

También se ha observado que la exposición de ovocitos a soluciones altamente concentradas en ACPs y a una velocidad de enfriamiento ultrarrápida induce la formación de múltiples ásteres cerca del pronúcleo masculino después de la FIV. Por lo tanto, se puede producir una alteración en la migración y el desarrollo de los pronúcleos que podría resultar en un retraso de la primera división mitótica y un potencial reducido para la formación de blastocisto (Hara *et al.*, 2012).

- Daños a nivel de la función mitocondrial

Las mitocondrias son la única fuente de producción de energía en el ovocito. Estos orgánulos están involucrados en una gran variedad de actividades celulares (Duchen, 2000)

tales como la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa, la homeostasis del calcio libre, la síntesis de pirimidinas y esteroides, la señalización por calcio y los fenómenos de apoptosis (Wilding *et al.*, 2009). Además, son importantes en la reanudación de la meiosis en los primeros estadios de la embriogénesis.

Muchos estudios han demostrado que hay una asociación estrecha entre la actividad de las mitocondrias y el desarrollo embrionario temprano (Wilding *et al.*, 2001, Acton *et al.*, 2004, Wilding *et al.*, 2003). Se ha observado que una reducción en la producción de ATP mitocondrial se asocia con un desarrollo embrionario comprometido (Brevini *et al.*, 2005), pudiendo afectar a procesos vitales durante la fecundación y el desarrollo (Zander-Fox *et al.*, 2013).

La vitrificación también puede inducir una alteración de la distribución mitocondrial, así como la reducción del potencial de membrana, ocasionando, por tanto, un desarrollo deficiente tras la criopreservación. El potencial de membrana mitocondrial es la base del metabolismo energético en las células, a la vez que un índice sensible del daño celular. Chen *et al.* observó que, tras la vitrificación y desvitrificación, el potencial de membrana mitocondrial sufría cambios. Sin embargo, después de 4 h de incubación, el potencial se recuperaba a niveles similares de ovocitos frescos (Chen *et al.*, 2012).

La alteración en la función mitocondrial normal tras la vitrificación, podría también ser responsable del incremento en los niveles de especies reactivas observados en los ovocitos desvitrificados (Somfai *et al.*, 2007, Gupta *et al.*, 2010). Un estudio reciente sugiere que el potencial redox de los ovocitos resulta afectado tras la vitrificación, implicando una disfunción del aparato mitocondrial ovocitario (Nohales-Corcoles *et al.*, 2016).

- Daños a nivel de la ZP

La ZP es una membrana glicoproteica que rodea la membrana plasmática de ovocitos y embriones. Esta juega un papel crítico en la fecundación y en el bloqueo de la polispermia posterior debido a la modificación que sufre tras la reacción cortical. Durante la crioconservación de los ovocitos, los ACPs causan aumentos transitorios de calcio en el oolema (Larman *et al.*, 2006), desencadenando en algunos casos la exocitosis de gránulos corticales (Kline and Kline, 1992). Este hecho es suficiente para causar el endurecimiento de la ZP y comprometer la penetración espermática (Pickering *et al.*, 1991).

Además, durante el calentamiento, una vez se han recuperado los ovocitos y embriones del NL, es posible encontrarlos dañados con algún tipo de fractura. Si la fractura afecta solo a la ZP, las células podrían sobrevivir, aunque perderían la protección que esta ofrece (Rall and Meyer, 1989). Se considera que estas fracturas se producen por las tensiones mecánicas

durante el cambio de volumen no uniforme del medio de suspensión durante el cambio de fase (Kasai *et al.*, 1996).

- Alteraciones en la expresión génica

La criopreservación afecta negativamente a la expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo, la apoptosis, y el ciclo celular, así como a genes importantes para la interacción espermatozoides-ovocitos (Moussa *et al.*, 2014).

Según algunos estudios, tanto la congelación lenta como la vitrificación de ovocitos pueden afectar la expresión de genes con importantes funciones biológicas, con un efecto más perjudicial en el caso de la congelación lenta (Chamayou *et al.*, 2011). Después de la fecundación y hasta la activación del genoma embrionario, el ovocito aporta los ARN necesarios para el desarrollo del embrión. Si tras la criopreservación ovocitaria disminuye la cantidad de los ARN almacenados, las funciones biológicas podrían alterarse, llegando incluso a bloquearse el desarrollo embrionario.

Además, se ha observado una amplia gama de consecuencias que resultan de la vitrificación de embriones de ratón, relacionadas con genes que regulan el metabolismo, el ciclo celular o el desarrollo (Mamo *et al.*, 2006, Boonkusol *et al.*, 2006).

Algunos investigadores también han estudiado los efectos epigenéticos de la vitrificación de ovocitos y embriones (Spinaci *et al.*, 2012, Zhao *et al.*, 2013). Sin embargo, las conclusiones de estos estudios son contradictorias, lo que sugiere que los efectos de la vitrificación en los patrones de metilación de genes varían de una manera dependiente en especies, etapa de desarrollo y genes, y también puede depender del tamaño de las regiones genómicas analizadas (Zhao *et al.*, 2013).

2. Morfocinética y tecnología *time-lapse*

La introducción de la tecnología *time-lapse* en los laboratorios de FIV supone una gran ventaja para la embriología, ya que permite observar el desarrollo de los embriones ininterrumpidamente sin afectar sus condiciones óptimas de cultivo. Es por este motivo que, hoy en día, se considera un método seguro y efectivo para el monitoreo de los embriones humanos, capaz de proporcionar una gran cantidad de información sobre su desarrollo *in vitro*. La posibilidad de observar el ritmo de sus divisiones y anotar cada uno de los eventos celulares permite el análisis de los embriones desde un punto de vista morfocinético. De esta forma, la información obtenida desde esta evaluación dinámica de los embriones se ha utilizado para intentar mejorar los criterios de selección, y con ellos las tasas de implantación y embarazo.

2.1. La importancia de la selección embrionaria

La identificación del embrión con mayor potencial de implantación y capacidad para mantener un embarazo viable es uno de los principales objetivos de la embriología. De hecho, es una tarea complicada que requiere de especialización y entrenamiento por parte de los embriólogos clínicos. Desde los inicios de la RA, la selección embrionaria se ha realizado en base al desarrollo y características morfológicas de los embriones. A pesar de que se haya utilizado como método de selección de forma casi exclusiva, no es del todo fiable y los resultados que ofrece no siempre son satisfactorios. Muchos de los embriones transferidos clasificados con las mejores categorías según los criterios de selección de diferentes asociaciones profesionales (ASRM, Asebir) no llegan a implantar, lo que muestra las carencias y limitaciones que tiene la morfología para ser utilizada como único sistema de selección embrionaria.

La transferencia de un único embrión en un ciclo de FIV es la mejor estrategia para evitar un embarazo múltiple y los riesgos que este conlleva (Walker *et al.*, 2004). Sin embargo, en estos casos, la tasa de embarazo podría verse disminuida, razón por la que en muchos laboratorios la transferencia única todavía no es una práctica habitual. Por esta razón, durante los últimos años, los esfuerzos destinados a mejorar las tasas de embarazo se han dirigido en la búsqueda de nuevos marcadores de viabilidad embrionaria que, complementando a los criterios de selección actuales, permitan identificar el embrión con mayores probabilidades de implantación. De esta forma, se podría aumentar la tasa de embarazo sin la necesidad de transferir más de 1 embrión y, por lo tanto, evitando los embarazos múltiples y sus consecuencias. En esta línea, se han propuesto nuevas estrategias de selección como por ejemplo: el cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto (Thomas *et al.*, 2010), el cribado cromosómico a través de array-CGH (Gutierrez-Mateo *et al.*, 2011) o NSG (Martin *et al.*, 2013), y el estudio de la cinética embrionaria a través de los sistemas *time-lapse* (Meseguer *et al.*, 2011).

La problemática de la selección embrionaria se incrementa en el caso de los embriones desvitrificados. De forma habitual, de entre todos los embriones vitrificados de una paciente, se selecciona al candidato para desvitrificar en base a su desarrollo y morfología durante el ciclo en fresco. No es extraño que muchos de los embriones mejor clasificados morfológicamente antes de la vitrificación, no mantengan sus características cuando vuelven a temperatura ambiente. Esto sucede porque durante de la vitrificación y desvitrificación, los embriones se someten a múltiples cambios morfológicos que eventualmente pueden dificultar su evaluación una vez desvitrificados. Este problema se manifiesta sobre todo en el caso de

INTRODUCCIÓN

embriones en estadio de blastocisto. Estos a menudo se colapsan inmediatamente después de la desvitrificación y, por lo tanto, es necesario mantenerlos en cultivo durante un tiempo para evaluarlos con mayor precisión. Algunos investigadores recomiendan evaluar la supervivencia y la calidad 2-4 horas después de la desvitrificación (Kosasa *et al.*, 2005, Shu *et al.*, 2009). De hecho, la capacidad de re-expandir tras este tiempo se considera un importante indicador del potencial del blastocisto (Desai and Goldfarb, 2005, Ebner *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos necesitan más tiempo para volver a expandir, y una sola evaluación no sería suficiente para evaluar su calidad. Además, el incremento en el tamaño del blastocito que ocurre durante la re-expansión es a veces difícil de evaluar porque depende del tiempo y puede cambiar durante los colapsos. En tales casos, las evaluaciones de estos blastocistos deben posponerse.

La Figura 7 muestra la evolución de la política de criotransferencias embrionarias según la SEF desde el año 2000 hasta el 2016. Los datos marcan una tendencia a la transferencia de un solo embrión, lo que implica la necesidad de desarrollar nuevos métodos de evaluación del potencial de estos embriones.

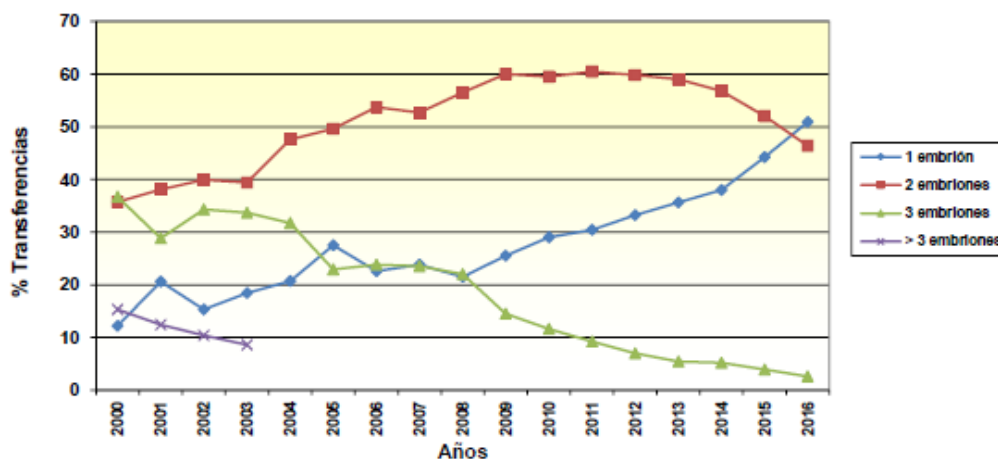


Figura 7. Evolución de la política de criotransferencias embrionarias. SEF 2000-2016.

2.1.1. Evaluación morfológica vs. morfocinética

La evaluación morfológica ha sido siempre el principal método para evaluar los embriones. Generalmente, estos se examinan bajo un microscopio invertido con una ampliación de 400x y se evalúan siguiendo unos criterios de selección establecidos en unos momentos concretos del desarrollo. Con el fin de estandarizar los criterios entre los centros de RA, diferentes asociaciones profesionales han propuesto sistemas de evaluación que incluyen

las variables morfológicas más relevantes de acuerdo con la literatura (ALPHA Scientists In Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group Embryology, 2011). Estos métodos de selección incluyen el análisis de los embriones desde sus etapas iniciales hasta la transferencia, y entre los parámetros analizados se incluye el número de células, la simetría, la fragmentación, la compactación celular y la blastulación, entre otros. La calidad morfológica de los embriones ha demostrado estar relacionada con las probabilidades de implantación y varias publicaciones han recomendado una evaluación secuencial de la morfología embrionaria como medio para mejorar su selección (Neuber *et al.*, 2006).

Aunque este sistema de evaluación presenta la ventaja de ser un método rápido, sencillo y no invasivo tiene una serie de limitaciones que a continuación se describen. Dado que la evaluación embrionaria es realizada por un embriólogo, se considera un método de análisis subjetivo, propenso a variaciones inter- e intraobservador (Baxter Bendus *et al.*, 2006) y, por lo tanto, poco estandarizado. Además, el desarrollo embrionario es un proceso dinámico con sucesivos cambios morfológicos en un corto espacio de tiempo (Lemmen *et al.*, 2008). Sin embargo, la evaluación morfológica clásica es mediante observaciones puntuales y estáticas con la consiguiente pérdida de información del desarrollo embrionario completo. Pero si hay algo que siempre ha supuesto una preocupación asociada a esta metodología, es el riesgo de comprometer las condiciones de cultivo estables durante las observaciones microscópicas fuera del entorno de incubación controlado. Es bien conocido que unas condiciones de cultivo óptimas son esenciales para un buen desarrollo embrionario y una correcta implantación (Mantikou *et al.*, 2013). Por lo tanto, aunque múltiples observaciones de los embriones proporcionen una mejor comprensión de su desarrollo, estas deben limitarse, ya que cada observación involucra la exposición de los embriones a condiciones subóptimas que pueden comprometer su viabilidad. Es por ello que, para evitar estresarlos innecesariamente, se ha tenido gran cuidado en encontrar intervalos de tiempo óptimos para su evaluación morfológica. Aun así, cada vez que se abre la puerta de un incubador, las concentraciones de gases y la temperatura sufren variaciones y, dependiendo de las características y estabilidad del propio aparato, se necesitará un tiempo determinado para re-establecer las condiciones apropiadas para el cultivo.

La tecnología *time-lapse* representa una herramienta útil para solventar muchas de estas limitaciones. El uso de un sistema automático de vigilancia de los embriones ofrece la posibilidad de obtener información objetiva y precisa sobre su desarrollo completo sin alterar sus condiciones de cultivo. Además, proporciona una gran cantidad de datos cuantitativos

sobre la cinética de sus divisiones. Este monitoreo continuo permite la determinación precisa del inicio, la duración y el intervalo entre las divisiones celulares. De este modo, los patrones de división anormales que pueden influir negativamente en el potencial implantatorio pueden ser identificados con facilidad. Además, las características morfológicas dinámicas de un embrión humano en desarrollo como la formación y desaparición de pronúcleos, la fragmentación, y la expansión y colapso de los blastocistos entre otras, también pueden quedar registradas con un sistema de estas características (Meseguer *et al.*, 2012). Estos parámetros morfocinéticos, se pueden usar para estimar la viabilidad del embrión y su potencial de implantación (Meseguer *et al.*, 2011, Meseguer *et al.*, 2012) y, por lo tanto, mejorar los resultados de un ciclo de FIV.

2.2. Características de los sistemas *time-lapse*

La tecnología *time-lapse* aplicada a la RA consiste en la captura consecutiva de imágenes digitales en intervalos de tiempo conocidos, bajo condiciones óptimas y constantes del cultivo embrionario. A pesar de haberse extendido su uso en los últimos años, esta herramienta no es nueva en los laboratorios de embriología. En 1929 se usó por primera vez para observar blastocistos de conejo (Lewis and Gregory, 1929), y más tarde se utilizó como herramienta en la investigación del desarrollo embrionario (Cole, 1967). Pero no fue hasta 1997 cuando se incorporó a los laboratorios de FIV de la mano de Payne y colaboradores (Payne *et al.*, 1997). Estos investigadores fueron los primeros en desarrollar un sistema de *time-lapse* para observar el proceso de fecundación y todos los eventos dinámicos que le siguen tras realizar la inseminación por ICSI. Sin embargo, esta tecnología no se implementó en la práctica clínica diaria por diversos motivos entre los que destaca la dificultad por mantener las condiciones de cultivo estables y apropiadas para el desarrollo embrionario.

En los últimos años, gracias a los avances en el campo de la bioinformática, se han desarrollado diferentes dispositivos capaces de incorporar la tecnología *time-lapse*, siendo todos mucho más adecuados para su uso clínico. Algunos de ellos presentan todos los componentes integrados en un único dispositivo como EmbryoScope® (Vitrolife), Geri (Genea Biomedex) y Miri® TL (Esco Medical). Otros, sin embargo, ofrecen la opción de introducir un microscopio dentro del propio incubador como Primo Vision® (Vitrolife) y EevaTM (Merck-Serono). La Figura 8 resume las diferencias desde el punto de vista técnico y clínico de los principales aparatos disponibles hoy en día para el uso clínico.


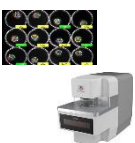
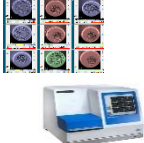


	Primo vision	Eeva	Embryoscope	Miri	Geri
Características					
Campo	Campo claro (LED verde)	Campo oscuro	Campo claro (LED roja)	Campo claro (LED roja)	Campo claro (LED naranja)
Toma de imágenes	Cada 10 minutos	Cada 5 minutos	Cada 10 minutos	Cada 5 minutos	Cada 5 minutos
Campos focales	1	1	7	4	11
Capacidad	1 cámara				
Cultivo embrionario	Grupo	Grupo	Individual	Individual	Individual
Nº de pacientes	1	1	6	6	6
Nº embriones/placa	9 ó 16	9	12	14	16
Incubador integrado	No	No	Si	Si	Si
Análisis de imagen	Manual	Automático	Manual	Manual	Manual

Figura 8. Resumen de los principales sistemas *time-lapse* aplicados a la RA.

2.2.1. Ventajas e inconvenientes de los sistemas *time-lapse*

Como se ha descrito anteriormente, los sistemas *time-lapse* presentan dos ventajas principales para su aplicación en la práctica clínica diaria: 1) Permiten obtención de información objetiva y precisa sobre el desarrollo embrionario completo que puede utilizarse para seleccionar a los embriones con mayor potencial implantatorio; 2) Proporcionan unas condiciones de cultivo estables durante todo el desarrollo embrionario ya que no es necesario sacar los embriones del incubador para su evaluación.

Además, presentan otras características que ayudan a que el trabajo diario sea más flexible. Como todo el desarrollo embrionario queda registrado, no es necesario que la evaluación se realice en los tiempos específicos establecidos para cada estadio embrionario como se hace cuando los embriones se cultivan en incubadores convencionales. También es posible detectar errores en la clasificación debidos a los cambios en la morfología que ocurren en un periodo corto de tiempo. Montag y colaboradores (Montag *et al.*, 2011) analizaron estas diferencias comparando datos provenientes de sistemas *time-lapse* e incubadores convencionales, demostrando que en solo 4 horas el 46% de los embriones cambiaban su número de células y, por tanto, su clasificación según los criterios de morfología convencional.

Otra ventaja de este tipo de dispositivos es la disminución de los costes en material fungible, medios de cultivo y aceite mineral, ya que las cantidades necesarias para el cultivo

son mucho menores que en los incubadores convencionales. Además, la posibilidad de entregar a los pacientes los videos del desarrollo embrionario así como un informe con las características y destino de cada uno de los embriones mejora el entendimiento del proceso de desarrollo *in vitro* por parte de los pacientes.

Sin embargo, los sistemas *time-lapse* presentan algunas limitaciones. En primer lugar, su alto precio dificulta la incorporación en muchas unidades de RA, o no permite la sustitución completa de todos los incubadores convencionales. Además, uno de los inconvenientes de los sistemas *time-lapse* es que no permite la rotación de los embriones, lo que provoca una observación visual limitada (Meseguer *et al.*, 2011). Los embriones humanos tienen forma esférica tridimensional así que durante la evaluación es importante observarlos en sus diferentes planos con el fin de detectar todas sus estructuras. Cuando se observan a través de un microscopio invertido, en ocasiones es útil rotarlos para una mejor visualización. Sin embargo, aunque los sistemas *time-lapse* toman fotografías en diferentes planos no existe la posibilidad de mover los embriones para detectar estructuras que no son visibles a partir de las imágenes proporcionadas. Además, pueden aparecer burbujas en la placa que impidan la visualización correcta de los embriones (Herrero *et al.*, 2013) y, por tanto, su clasificación. En ambos casos, habría que sacar la placa del incubador y visualizar los embriones a través de un microscopio invertido, del mismo modo que cuando se cultivan en incubadores convencionales.

2.3. El ciclo celular y el desarrollo embrionario

El estudio del desarrollo embrionario desde el punto de vista morfocinético requiere la comprensión de los procesos biológicos que acontecen durante cada una de las divisiones celulares. Para ello vamos a repasar las diferentes etapas del ciclo celular y los fenómenos que ocurren en cada una de ellas.

El ciclo de división es un proceso que tiene lugar durante la vida de una célula. Está comprendido por una serie de sucesos complejos que dan lugar al crecimiento de la célula, a la replicación de su material genético y, posteriormente, a su división, originándose como resultado dos células hijas. De esta forma queda garantizada la continuidad de la información hereditaria a las siguientes generaciones.

La duración del ciclo celular varía entre células de diferentes especies y tejidos, pero siempre se divide en dos fases: la fase M o mitosis, dividida a su vez en varias etapas (profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis) y la interfase (Figura 9).

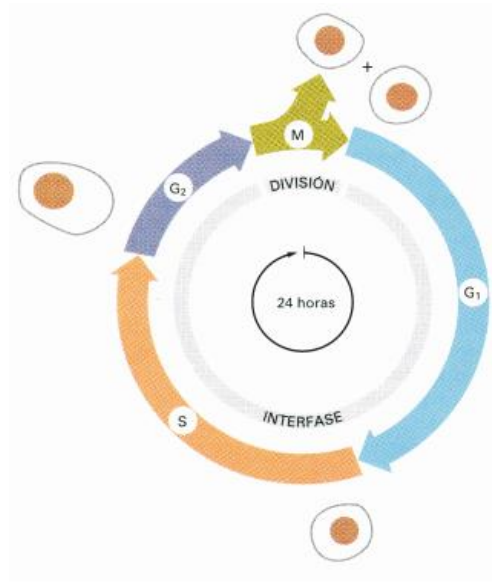


Figura 9. Fases del ciclo celular. Imagen extraída de Alberts, Barcelona 2010.

La interfase es el periodo más largo del ciclo celular donde se produce el crecimiento de la célula, duplicación del material genético y los preparativos necesarios para la división celular. En ella se distinguen 3 etapas, G1, S y G2:

La fase G1 es la etapa de proliferación celular donde la célula sintetiza activamente ARN y proteínas. La duración de la fase G1 es muy variable según las diferentes especializaciones celulares. Durante esta etapa la célula controla su propio tamaño y su entorno, y cuando llega el momento, da el paso para duplicar su material genético y concluir el ciclo celular. Esto sucede si supera un punto de restricción o punto R, en el que la célula decide si se divide o no según sean sus condiciones externas e internas. Una vez superado este punto, la célula se ve obligada a completar el ciclo pasando por las fases S, G2 y M. Antes de duplicar su material genético, la célula en G1 puede detener su progresión en el ciclo celular y quedar en un estado de "reposo" o "quiescencia" sin superar el punto R y, por tanto, sin dividirse. Entonces se considera que la célula se encuentra en la llamada fase G0 del ciclo celular que, dependiendo del tipo celular, puede durar días, semanas o incluso años.

Si la célula supera el punto de restricción R, entrará en la fase S donde se produce la replicación del ADN nuclear. Finalmente, en la fase G2 se sintetizan proteínas y ARN necesarios para la división celular. En esta etapa existe otro punto de control para verificar que el ADN se ha duplicado sin problemas y conserva su integridad. Si los mecanismos en el punto de control detectan problemas con el ADN, el ciclo celular se detiene y la célula intenta completar la replicación del ADN o reparar el ADN dañado.

INTRODUCCIÓN

La mitosis es la división de las células diploides en dos células también diploides genéticamente idénticas (Figura 10). En la profase la envoltura nuclear se descompone, el nucléolo desaparece, el núcleo se condensa en cromosomas visibles, y los microtúbulos de la célula se reorganizan para formar el huso mitótico, que eventualmente separará los cromosomas (Alberts, Barcelona 2010).

En la metafase, los cromosomas, ya duplicados, se alinean en el huso mitótico, listos para la segregación. En esta etapa existe otro punto de control M donde la célula examina si todas las cromátidas hermanas están unidas correctamente a los microtúbulos del huso. La separación de los cromosomas duplicados marca el comienzo de la anafase, durante la cual las cromátidas hermanas se mueven cada una hacia uno de los polos del huso. En la telofase, la célula comienza a restablecer su estructura inicial: el huso desaparece, los cromosomas comienzan a descondensarse y reaparece el nucleolo y la membrana celular. Finalmente, la célula se divide en dos por un proceso llamado citocinesis, que tradicionalmente se considera como el final de la fase mitótica del ciclo celular. En la mayoría de las células, la totalidad de la fase M es de alrededor de una hora, que es solo una pequeña fracción de la duración total del ciclo celular.

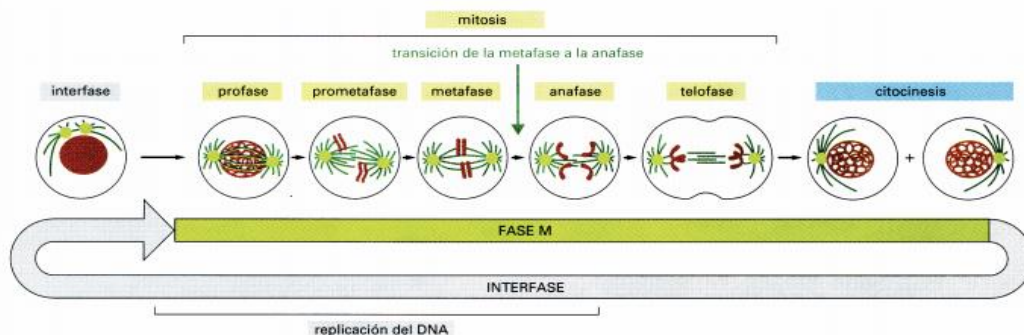


Figura 10. Fases de la mitosis. Imagen extraída de Alberts, Barcelona 2010.

Los embriones tempranos de muchas especies animales experimentan ciclos celulares excepcionalmente rápidos, a través de los cuales la célula no aumenta de tamaño y se subdivide en células hijas más pequeñas. En estos ciclos celulares no hay crecimiento, por lo que las fases M y S se alternan sin que tengan lugar las etapas G1 y G2 (Alberts, Barcelona 2010).

En los humanos, el desarrollo empieza con el proceso de fecundación, en el que el gameto masculino haploide se fusiona con la membrana del ovocito secundario para dar lugar a una única célula diploide. Para que este hecho tenga lugar deben completarse una serie de etapas en ambos gametos. Los espermatozoides, sufren un proceso de activación conocido como capacitación espermática, en el que se produce un cambio en la permeabilidad de la

membrana a los iones de calcio además de la adquisición de una movilidad hiperactiva. Gracias a la capacitación, cuando el espermatozoide entra en contacto con la ZP, puede liberar su contenido acrosomal, lo que le permite abrirse paso a través de la misma y llegar hasta la membrana del ovocito. Una vez que entran en contacto ambas membranas, se fusionan, cesa la actividad flagelar y la cabeza espermática se incorpora al citoplasma del ovocito. La fusión entre ambos provoca una serie de cambios en el metabolismo del ovocito, como la liberación de calcio y la elevación del pH intracelular. Este proceso de activación ovocitaria va acompañado por dos fenómenos visibles: una reacción cortical y la reanudación de la meiosis. La reacción cortical consiste en la descarga de los gránulos corticales del ovocito al espacio perivitelino, cuyo efecto determina un bloqueo de la polispermia. El incremento de calcio intracelular permite al ovocito reanudar la meiosis que finaliza con la extrusión del segundo CP. Este hecho marca el inicio del primer ciclo celular del ovocito fecundado, conocido como cigoto. A partir de este momento se producen una serie de eventos que culminarán con la primera división mitótica. Los cromosomas femeninos y masculinos se descondensan y forman los pronúcleos materno y paterno. En este punto, el ovocito es una célula binucleada que cuenta con el número normal de cromosomas de la especie y puede comenzar el ciclo de división celular normal. Después de la replicación del ADN, los dos pronúcleos se acercan, las membranas pronucleares se disgregan y los cromosomas homólogos de los dos pronúcleos se organizan en el centro del huso mitótico. Todo está preparado para la primera división mitótica.

Como hemos mencionado anteriormente, las primeras divisiones mitóticas tras la formación del cigoto se producen sin observar un aumento del tamaño del embrión. Al no haber crecimiento ni síntesis de macromoléculas, estas dependerán únicamente del ARN y proteínas maternas. Posteriormente, al alcanzar el tercer día de desarrollo, se produce la activación del genoma embrionario e inmediatamente después, el embrión experimenta el proceso de compactación que implica la formación de uniones estrechas entre sus blastómeras, formando una mórula (Figura 11). Estas uniones juegan un papel fundamental en la comunicación celular y en la diferenciación.



Figura 11. Primeras etapas del desarrollo embrionario (del ovocito al estadio de morula).

INTRODUCCIÓN

A partir de este momento, el embrión empieza a re-organizarse y a expandir formando una cavidad con fluido en su interior llamada blastocelo. En este estadio del desarrollo conocido como blastocisto, las blastomeras se diferencian en dos tipos de estructuras, el trofoctodermo y la masa celular interna. Las células del trofoctodermo se polarizan hacia el exterior y se vuelven elípticas mientras que la masa celular interna permanece morfológicamente indiferenciada.

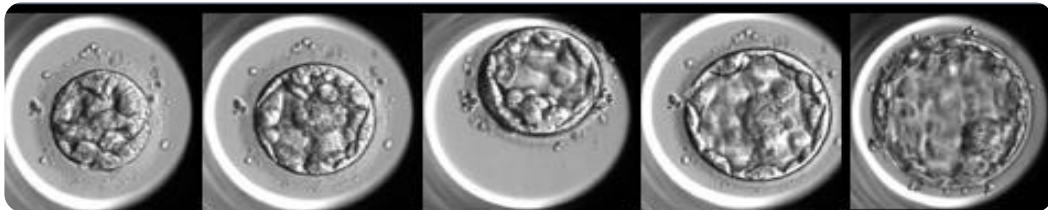


Figura 12. Desarrollo del blastocisto.

En este estadio, las células dejan de ser totipotentes puesto que ya no podrán dar lugar a un organismo completo. El trofoctodermo dará lugar a la placenta y otras estructuras necesarias para el embarazo, mientras que la masa celular interna dará lugar al embrión. En las últimas etapas, el blastocisto aumentará en tamaño y se incrementará la cantidad de líquido del blastocelo (Figura 12). Finalmente, se producirá la eclosión y será libre para implantar en las paredes del útero.

2.4. Morfocinética embrionaria

2.4.1. Marcadores morfocinéticos

Aunque la morfocinética ha tomado una mayor relevancia en los últimos años, la importancia de la cinética embrionaria ya se observó hace más de 30 años. Por aquel entonces, Edward y colaboradores estudiaron el fenómeno de la división temprana (definida como aquella que se produce a las 25-27 horas post-ICSI dando lugar a un embrión de dos células) y el impacto que esta tenía en las tasas de gestación (Edwards *et al.*, 1984). Desde ese momento, la división temprana se estudió por diferentes grupos (Shoukir *et al.*, 1998, Sakkas *et al.*, 1998, Salumets *et al.*, 2003, Ciray *et al.*, 2006), quienes observaron que esta era un indicador de viabilidad embrionaria al encontrar mayores tasas de implantación en los embriones que la experimentaban.

En muchos de estos estudios, las transferencias combinaban embriones con divisiones tempranas y divisiones tardías. Además, al no utilizar sistemas *time-lapse*, la detección de este fenómeno se restringía a un momento puntual, desconociendo en muchos casos el momento exacto en el que ocurría. Por tanto, a partir de estos estudios, es difícil obtener conclusiones

definitivas acerca de la importancia de este parámetro y su relación con las tasas de implantación.

Sin embargo, con la monitorización continua de los embriones se ha corroborado este hecho, pero teniendo en cuenta que en ocasiones las divisiones pueden ocurrir demasiado temprano, lo que se correlacionaría con peores tasas de implantación (Rubio *et al.*, 2012). De hecho, se ha establecido un rango óptimo en relación a la primera división embrionaria que estaría asociado a tasas de implantación más altas, considerando los valores por encima y por debajo como indicadores de peor pronóstico.

En la última década, muchos estudios se han centrado en la búsqueda de marcadores morfocinéticos objetivos y cuantificables (Wong *et al.*, 2010, Meseguer *et al.*, 2011, Azzarello *et al.*, 2012, Campbell *et al.*, 2013), que representen tiempos exactos en los cuales se detecta un fenómeno celular dado. Actualmente, de acuerdo a las directrices propuestas para el análisis morfocinético del desarrollo embrionario existe una serie definida de marcadores (Ciray *et al.*, 2008). Además, también existen variables calculadas a partir de estos parámetros que representan los procesos dinámicos del desarrollo embrionario, como por ejemplo la duración de un ciclo celular (Tabla 2).

Estos parámetros asociados con diferentes estadios del desarrollo se han correlacionado con la viabilidad embrionaria y resultados clínicos con el fin de identificar los más relevantes y desarrollar modelos jerárquicos que mejoren la selección embrionaria.

Tabla 2. Parámetros morfocinéticos	
Parámetros	Definición
t0	Hora ICSI
tPB2	Tiempo hasta extrusión del 2º CP
tPN	Tiempo hasta que la fecundación se confirma
tPNa	Tiempo hasta que aparecen los pN
tPNf	Tiempo hasta que desaparecen los PN
tZ	Tiempo hasta que se anota la clasificación PN
t2 a t9	Tiempo hasta alcanzar un específico número de células
tSC	Tiempo hasta observar primera evidencia de compactación
tM	Tiempo hasta alcanzar el estadio de mórula
tSB	Tiempo hasta el inicio de blastulación
tB	Tiempo hasta alcanzar el estadio de blastocisto
tEB	Tiempo hasta que el blastocisto expande
tHB	Tiempo hasta que el blastocisto eclosiona
VP (tPNf-tPNa)	Duración de PN
cc1 (t2-tPB2)	Duración del 1º ciclo celular
cc2 (t3-t2)	Duración del 2º ciclo celular
cc3 (t5-t3)	Duración del 3º ciclo celular
s2 (t4-t3)	Sincronía del 2º ciclo celular
s3 (t8-t5)	Sincronía del 1º ciclo celular

2.4.2. Identificación de marcadores morfocinéticos con relevancia clínica

Con la introducción de los equipos *time-lapse*, los investigadores se apresuraron a identificar los parámetros morfocinéticos que tenían relación con la viabilidad embrionaria y, por tanto, podrían utilizarse como marcadores en la práctica clínica. Lemmen (Lemmen *et al.*, 2008), en un estudio retrospectivo con 102 ovocitos fecundados, observó que los embriones tenían un mayor número de células en día 2 de desarrollo cuando la desaparición de los pronúcleos y la primera división ocurrían de forma más temprana. Además, la sincronía en la aparición de los núcleos después de la primera división se asoció significativamente con la tasa de embarazo. Wong y colaboradores (Wong *et al.*, 2010) observaron que el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto se correlacionaba con: (i) la duración de la primera división citoplasmática de 1 a 2 células; (ii) el tiempo de división de 2 a 3 células y (iii) el tiempo entre la división de 3 a 4 células.

En 2011, en un extenso y relevante estudio, Meseguer y colaboradores (Meseguer *et al.*, 2011) analizaron los tiempos exactos de numerosos parámetros morfocinéticos y su relación con las tasas de implantación. Para ello evaluaron 247 embriones transferidos con datos de implantación conocida que habían sido cultivados en un sistema *time-lapse*. En este estudio, se definió el tiempo de división como el tiempo exacto en el que las nuevas blastómeras se separan completamente por membranas claramente definidas. Así, se evaluó la primera división a 2 células (t_2), la segunda división a 3 células (t_3), la tercera (t_4) y la cuarta (t_5). Además, se evaluaron los parámetros relacionados con la duración de los ciclos celulares: duración del segundo ciclo celular (cc_2), el tiempo que el embrión permanece en 2 células ($t_3 - t_2$), la sincronía de la segunda división celular (s_2) y el tiempo que transcurre de 3 a 4 células ($t_4 - t_3$). Una vez definidas estas variables se establecieron rangos óptimos asociados a mayores tasas de implantación.

Además, también se describieron algunos eventos morfológicos aberrantes que se asocian con un pobre potencial de implantación. El primero es la división directa de 1 a 3 células ($cc_2 = t_3 - t_2 < 5$ horas). El segundo hace referencia al tamaño de las blastómeras tras la primera división celular. Los resultados mostraron que los embriones de dos células con blastómeras asimétricas (refiriéndose como tal a una diferencia de tamaño mayor del 25% entre ambas) también tenían baja capacidad de implantación. Por último, el tercer fenómeno alude a la multinucleación en el estadio de 4 células. Se observó que la presencia de una sola blastómera multinucleada tenía efectos importantes en cuanto a las tasas de implantación embrionaria.

- ***Morfocinética y divisiones anómalas***

Rubio y colaboradores (Rubio *et al.*, 2012), tratando de confirmar las observaciones de Meseguer (Meseguer *et al.*, 2011) en relación a la división directa, realizaron un estudio retrospectivo multicéntrico con 5225 embriones en el que evaluaron la relación entre este fenómeno y los resultados clínicos. Estos investigadores pudieron confirmar que los embriones que la experimentaban ($t_3 - t_2 < 5$ h) exhibían tasas de implantación muy bajas (1,2%) y por lo tanto, corroboraron que su exclusión mejoraría las tasas de éxito. Athayde Wirka analizó diferentes fenotipos atípicos del desarrollo de 651 embriones como la singamia y la primera división anormales y también concluyó que estos embriones mostraban un potencial de desarrollo más bajo (Athayde Wirka *et al.*, 2014). Estas observaciones también fueron confirmadas por Zhan (Zhan *et al.*, 2016) y Goodman (Goodman *et al.*, 2016) años más tarde. En la misma línea, Liu (Liu *et al.*, 2016) demostró que los embriones que experimentaban la fusión de sus blastómeros, fenómeno conocido como división inversa, veían comprometida su viabilidad.

- ***Marcadores asociados a la formación de blastocisto***

Con el fin de favorecer la selección embrionaria, sobre todo en los casos en los que se transfiere un único embrión, se han desarrollado diferentes estrategias entre las que destaca el cultivo prolongado de los embriones hasta el estadio de blastocisto. Actualmente, con los avances en cultivo embrionario, alrededor de un 50-60% de los embriones fecundados llega hasta este estadio (Gardner *et al.*, 2000). El resto, de menor calidad, detendría su desarrollo en los estadios más tempranos. De este modo, la transferencia en estadio de blastocisto se considera un método de autoselección de los embriones con más potencial de la cohorte. Además, en este estadio hay una mayor sincronía con el endometrio, ya que es la etapa en la que los embriones consiguen implantar. Sin embargo, la realización del cultivo prolongado tiene sus riesgos y consecuencias. Por un lado, el riesgo de cancelaciones es mayor ya que existe la posibilidad que todos los embriones detengan su desarrollo en estadios tempranos. Y, por el otro, el coste económico también se incrementa, ya que es necesario dotar al laboratorio de equipos seguros y estables para el cultivo.

Aunque las ventajas frente a una transferencia en estadios tempranos han sido bien documentadas (Wang and Sun, 2014b), hay laboratorios que por diversas razones no pueden implantar esta estrategia. En estos casos, resulta muy útil el estudio de marcadores que predigan la llegada a blastocisto (Figura 13).

Basándose en el estudio publicado por Meseguer (Meseguer *et al.*, 2011), Cruz y colaboradores trataron de correlacionar parámetros cinéticos en estadíos tempranos embrionarios con la capacidad de esos embriones de llegar a blastocisto (Cruz *et al.*, 2012). También correlacionaron los tiempos exactos de las divisiones con la morfología de los blastocistos obtenidos. Con los resultados obtenidos concluyeron que la evaluación embrionaria utilizando la tecnología *time-lapse* era una herramienta útil en la predicción de la formación y calidad morfológica de los blastocistos.

Del mismo modo, Dal Canto (Dal Canto *et al.*, 2012) mostró que las divisiones desde el estadio de 2 células a 8 células ocurren antes en los embriones que llegan a blastocisto, expanden e implantan. Asimismo, Hashimoto (Hashimoto *et al.*, 2012) indicó que los intervalos de tiempo entre la etapa de 3 y 4 células, y entre las etapas de 5 y 8 células fueron más cortas en aquellos embriones con el potencial de desarrollarse en blastocistos de buena calidad en comparación con aquellos que presentan una calidad subóptima. Kirkegaard y colaboradores (Kirkegaard *et al.*, 2013) también realizaron un estudio prospectivo en 2013 con 571 embriones, y mostraron que los parámetros recolectados durante las primeras 48 horas de cultivo, podían predecir el desarrollo de blastocistos de buena calidad.

Ese mismo año, Conaghan y colaboradores (Conaghan *et al.*, 2013) realizaron un estudio multicéntrico para desarrollar y validar un algoritmo para predecir la formación de blastocistos. Un total de 1727 embriones fueron monitorizados mediante un sistema *time-lapse*. El tiempo entre el final de la 1ª mitosis y el inicio de la 2ª, y el intervalo de tiempo entre la 2ª y 3ª mitosis resultaron ser factores clave en el modelo de predicción. Desai (Desai *et al.*, 2014) también analizó los parámetros relacionados con la predicción de llegada a estadio de blastocisto y concluyó que los embriones que alcanzan este estadio exhibían diferentes tPNF (tiempo de desvanecimiento pronuclear), t2, t4, t8, s1, s2, s3 y cc2 (t3-t2) en comparación con los que no lograban alcanzar este estadio o se convertían en blastocistos de mala calidad.

Recientemente, Motato (Motato *et al.*, 2016a) analizó 17 parámetros morfocinéticos en 7483 embriones y concluyó que los intervalos de tiempo entre la ICSI y la formación de mórula, y entre el estadio de 5 y 8 células eran buenos predictores de la formación de blastocistos.

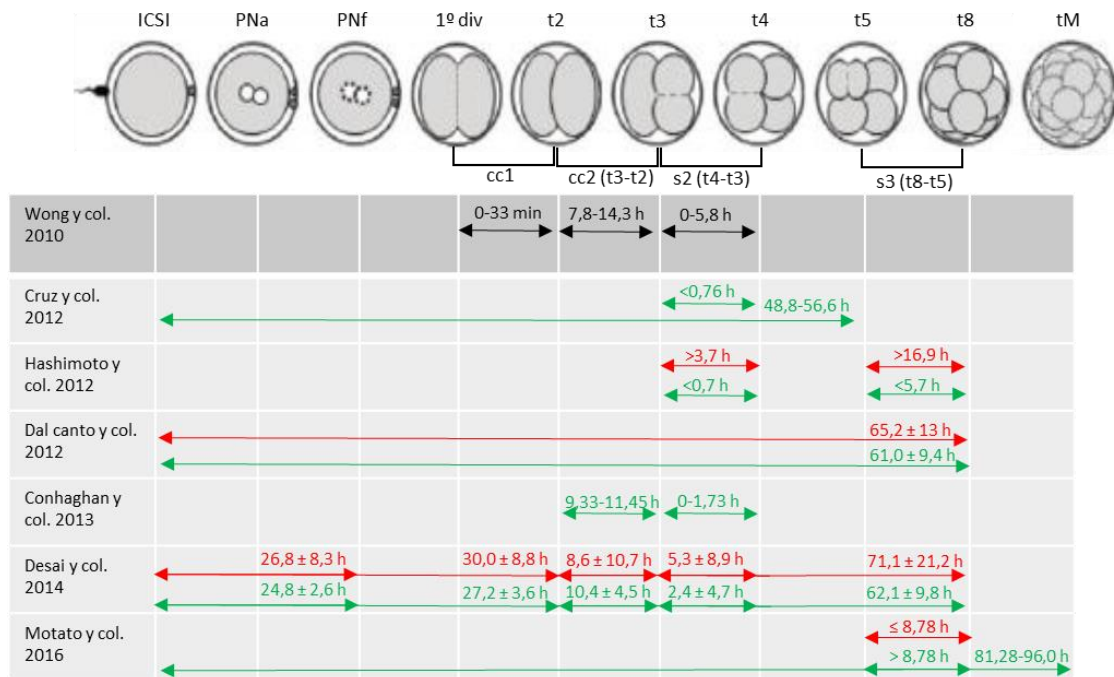


Figura 13. Resumen de los marcadores de predicción de llegada a blastocisto según diferentes autores. Los valores dentro de los rangos óptimos son mostrados en verde, mientras que los que están fuera de rango se muestran en rojo. Adaptada de Kaser and Racowsky, 2014.

A pesar de existir una variabilidad en cuanto a los resultados entre los diferentes estudios, sí que parece existir un consenso en cuanto a marcadores relevantes de viabilidad embrionaria.

- **Marcadores asociados a la probabilidad de implantación**

El primer modelo de clasificación jerárquica en el que se combinan los conceptos de morfocinética y potencial de implantación fue propuesto por Meseguer (Meseguer *et al.*, 2011) y tuvo en cuenta los parámetros t5, s2 (t4-t3) y cc2 (t3-t2) como aquellas variables con mayor valor predictivo. Este modelo divide a los embriones en 6 categorías desde la A a la F. Además, 4 de estas categorías (A-D) se subdividen en 2 subcategorías (+) o (-), permitiendo finalmente, clasificar los embriones en 9 categorías con decreciente probabilidad de implantación desde 52% a 8%. Este algoritmo fue validado años más tarde mediante un estudio prospectivo y aleatorizado (Rubio *et al.*, 2014) donde se compararon resultados clínicos de embriones cultivados en incubadores convencionales y evaluados mediante morfología (grupo control) con aquellos cultivados en un sistema *time-lapse* y seleccionados mediante el algoritmo (grupo estudio). Los autores concluyeron que la tasa de implantación evolutiva podía aumentar hasta en un 10% si se utilizaba la morfocinética para la selección embrionaria.

INTRODUCCIÓN

Otros autores han tratado de correlacionar los parámetros morfocinéticos con la implantación o resultados clínicos (Figura 14). Dal Canto (Dal Canto *et al.*, 2012) observó que los embriones con valores de t8 más cortos implantaban en mayor grado. Azzarello (Azzarello *et al.*, 2012a) estudió la relación entre la dinámica pronuclear y la tasa de RNV y observó que los embriones que presentaban una desaparición pronuclear temprana eran de peor pronóstico. Kirkegaard (Kirkegaard *et al.*, 2013) también relacionó estos parámetros tempranos con las tasas de embarazo en un estudio prospectivo, pero no observó diferencias entre los embriones que lograban un embarazo y aquellos que no lo hacían.

Tomando como referencia el algoritmo publicado por Meseguer, Basile (Basile *et al.*, 2015) publicó otra versión del mismo, en el que analizó datos de 4 diferentes clínicas, identificando esta vez los parámetros t3, cc2 y t5 como las más predictivos de implantación.

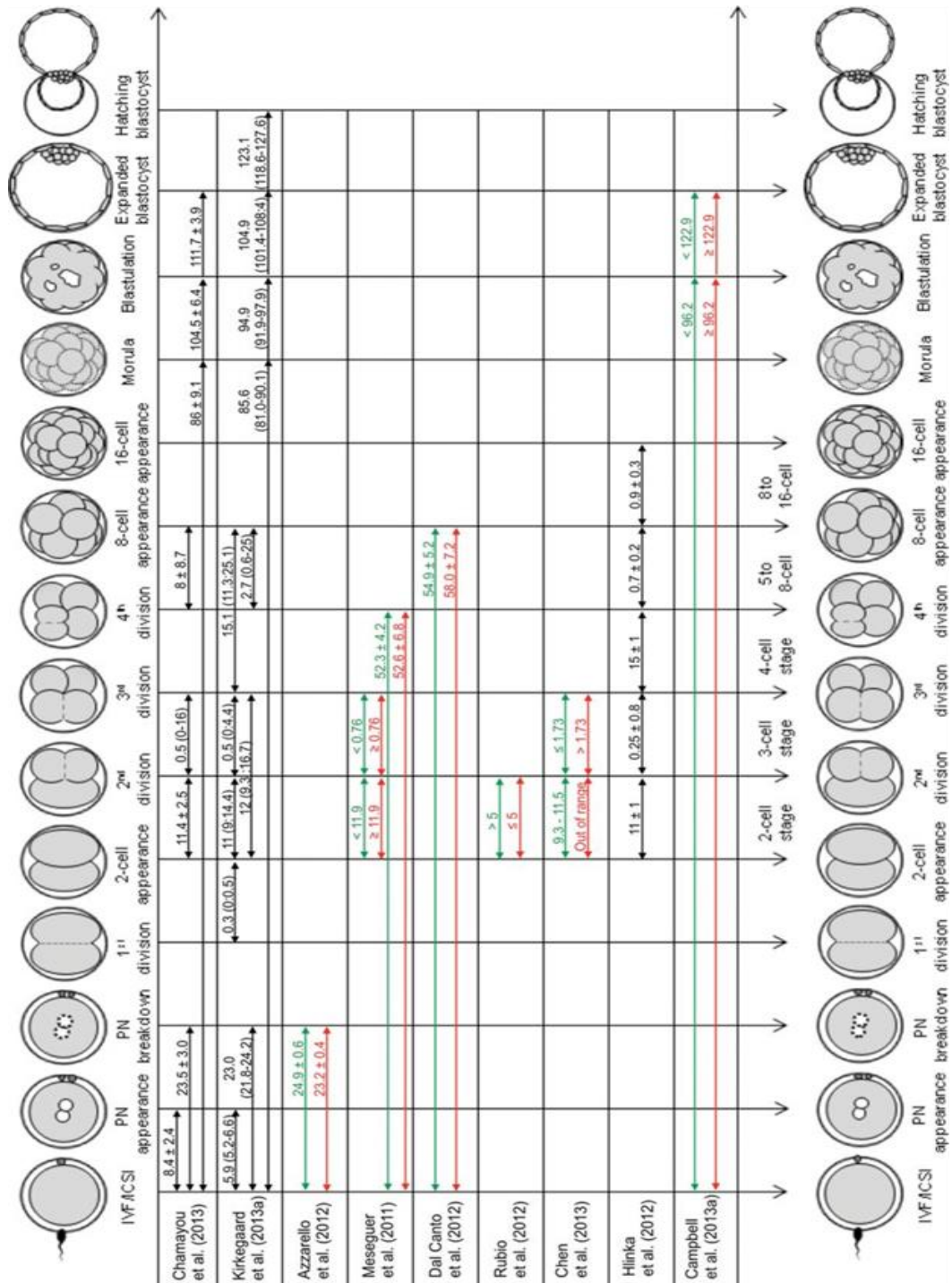


Figura 14. Resumen de los marcadores de predicción de implantación según diferentes autores. Figura extraída de Kaser and Racowsky, 2014.

- ***Marcadores morfocinéticos asociados a la ploidía***

La relación entre los parámetros morfocinéticos y el contenido cromosómico también ha sido analizada en diferentes estudios. Chavez (Chavez *et al.*, 2012a) observó que los valores de la duración del primer y segundo ciclo celular, así como de la sincronía de 2 a 3 células, podían ser utilizados para distinguir entre embriones euploides y aneuploides.

Del mismo modo, Basile (Basile *et al.*, 2014), analizó el comportamiento morfocinético de embriones cromosómicamente normales y anormales en una cohorte de 504 embriones. Con los datos obtenidos propuso un algoritmo de selección de embriones con una correcta ploidía basado en los parámetros t5-t2, cc3 y t5. Ese mismo año, Campbell y colaboradores también elaboraron un modelo que predecía el riesgo de aneuploidías basado en los parámetros tSB y tB (Campbell *et al.*, 2014). Los autores concluyeron que este tipo de modelo representa una buena herramienta para su uso en clínica, especialmente para pacientes que no tienen ninguna indicación obvia para PGT.

Recientemente, Del Carmen Nogales (Nogales *et al.*, 2017) elaboró un algoritmo para excluir embriones con anomalías cromosómicas, observando que la morfocinética se veía afectada en aquellos que presentaban aneuploidías.

Los nuevos conocimientos sobre la cinética del desarrollo embrionario han sido el punto de partida para el análisis del impacto de distintos factores intrínsecos y extrínsecos sobre los parámetros morfocinéticos (Ciray *et al.*, 2012, Freour *et al.*, 2013, Bellver *et al.*, 2013, Munoz *et al.*, 2013, Basile *et al.*, 2014), y su relación con la viabilidad embrionaria y resultados clínicos. Sin embargo, la cinética de los embriones generados a partir de ovocitos vitrificados es un campo muy poco explorado que podría aumentar nuestro conocimiento sobre el impacto que esta técnica tiene a nivel subcelular sobre los ovocitos humanos.

II. OBJETIVOS

Estudio I. Impacto de la vitrificación de ovocitos en la cinética embrionaria**Objetivo principal**

- Evaluar el efecto de la vitrificación de ovocitos en los parámetros morfocinéticos de los embriones generados a partir de estos, y compararlos con los valores que presentan los embriones desarrollados a partir de ovocitos frescos.

Objetivos secundarios

- Evaluar la distribución embrionaria según los rangos óptimos (asociados a probabilidades de implantación más alta) para cada parámetro morfocinético en ovocitos frescos y vitrificados.
- Evaluar la distribución embrionaria según cada categoría de clasificación basada en morfocinética en ovocitos frescos y vitrificados.
- Evaluar la tasa de implantación según cada categoría morfocinética en ovocitos frescos y vitrificados.

Estudio II. Análisis de la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados**Objetivo principal**

- Describir la dinámica morfológica de blastocistos desvitrificados mediante una monitorización continua, analizando su área, el grosor de la zona pelúcida y el grado de re-expansión de forma cuantitativa.

Objetivos secundarios

- Identificar nuevos marcadores objetivos y cuantificables capaces de predecir la implantación de los blastocistos desvitrificados.
- Desarrollar un modelo jerárquico que subdivida los blastocistos desvitrificados en categorías según su potencial de implantación.
- Comparar la capacidad de clasificación de los blastocistos en base a su morfología original y su dinámica morfológica de desvitrificación.
- Evaluar el modelo jerárquico utilizando otro set de embriones con el fin de validar su sensibilidad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La realización de ambos estudios se ejecutó dentro del marco legal impuesto por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal; de la ley 14/2007 de Investigación Biomédica y la ley 14/2006 sobre Técnicas de Reproducción Asistida. Además, los estudios contaron con la aprobación del Comité Ético del IVI, que certificó la idoneidad del protocolo en relación a los objetivos planteados.

Los dos estudios se realizaron en las instalaciones de IVI Valencia, a partir de embriones procedentes de ciclos de donación de ovocitos. Todos los procedimientos relacionados con esta técnica se llevaron a cabo de acuerdo a los protocolos estándar descritos previamente (Remohí *et al.*, 2008).

A continuación, se describen brevemente los procedimientos comunes a los dos estudios realizados y, posteriormente, se describe el diseño, las variables y el análisis estadístico empleado en cada uno de ellos.

1. Selección de las donantes

Las donantes tienen que cumplir con las siguientes características para ser incluidas en el programa de donación de ovocitos del IVI: i) mujeres con buena salud física y mental, con edad comprendida entre 18-35 años de edad, con ciclos menstruales regulares entre 21– 35 días, y sin antecedentes familiares hereditarios o enfermedades cromosómicas; ii) cariotipo normal; iii) IMC entre 18–29 kg/m²; iv) ausencia de ovarios poliquísticos, endometriosis, más de dos abortos involuntarios previos, o trastornos médicos o ginecológicos; y v) un resultado de detección negativa para enfermedades de transmisión sexual.

Todas las donantes deben ser informadas del procedimiento al que van a ser sometidas, y de las posibles complicaciones y aspectos legales de su donación. Las que están de acuerdo, deben firmar el consentimiento informado entregado por el centro.

En el momento de la donación, se selecciona la donante con mayor similitud fenotípica e inmunológica (Grupo sanguíneo y Rh) con la receptora y su entorno familiar.

1.1. Estimulación ovárica de las donantes

La finalidad de los protocolos de EOC es generar una respuesta supra-fisiológica con el fin de aumentar el número de ovocitos aspirados y, por tanto, el número de embriones disponibles para seleccionar, ya sea para transferir o vitrificar. Además, con la EOC se evitan los picos espontáneos y prematuros de LH, y se desencadena la ovulación cuando el especialista lo considera oportuno.

Los protocolos de EOC utilizados en el IVI para las donantes se describen a continuación:

1) En el protocolo largo con agonistas, las donantes recibieron dosis diarias de agonistas de la GnRH desde la fase lútea del ciclo anterior (Synarel, nafarelina, intranasal, Pfizer). Después de la menstruación, se inició la EOC con 150-225 UI/día de FSH recombinante (Gonal-F, Merck-Serono o Puregon, MSD), combinado con 75 UI/día de hMG (Menopur, Ferring). La dosis se ajustó a la respuesta ovárica y la inducción de la ovulación se realizó con 250 mg de hCG recombinante (Ovitrelle, Merck-Serono). 2) En los protocolos con antagonistas de la GnRH, la EOC se inició en el día 2 ó 3 después de la menstruación con 150-225 UI/día de FSH recombinante (Gonal-F, Merck-Serono o Puregon, MSD), combinado con 75 UI/día hMG (Menopur, Ferring Pharmaceuticals). La dosis se ajustó según la respuesta ovárica. Dosis diarias de 0,25 mg de Antagonista. La introducción del antagonista de la GnRH (Ganirelix, Orgalutran, MSD o Cetorelix, Cetrotide, Merck-Serono) se inició diariamente con una dosis de 0,25 mg, cuando al menos un folículo alcanzó 14 mm. En estos casos, una dosis única de agonista de GnRH (0,1 mg de triptorelina, Decapeptyl, Ipsen Pharma) se administró para desencadenar la maduración final de los ovocitos cuando al menos tres folículos medían más de 17,5 mm. La recuperación ovocitaria se realizó 36 horas después de la inducción de la ovulación. Los ovocitos MII recuperados se vitrificaron 2 horas después de la punción.

2. Receptoras

Las principales causas por las que las receptoras recurren a la donación de ovocitos son: mala calidad ovocitaria, enfermedades hereditarias transmisibles que no pueden ser detectadas por técnicas de PGT, mujeres con fallos repetidos en FIV, alteraciones cromosómicas en la mujer o en los embriones, y mujeres mayores de 40 años en las que la probabilidad de gestación con sus propios ovocitos está muy disminuida.

2.1. Preparación endometrial de las receptoras

El objetivo del tratamiento sustitutivo en las receptoras de ovocitos es lograr un crecimiento normal del endometrio mediante el suministro de estrógenos que promueven la proliferación endometrial y de progesterona que induce la transformación secretora del endometrio. De esta forma, se genera un ambiente óptimo para la implantación embrionaria y el mantenimiento de los estadios iniciales de la gestación. La preparación endometrial de las receptoras es la misma tanto para la transferencia de embriones en ciclos en fresco como en ciclos con embriones criopreservados.

En el caso de las receptoras que presentaban función ovárica, se emplearon agonistas de la GnRH con el fin de neutralizar la producción endógena de gonadotropinas y evitar su interferencia en los ciclos de donación de ovocitos. De este modo, este grupo de receptoras

recibieron una dosis única de agonista de depósito en la mitad de la fase lútea del ciclo anterior (3,75 mg de Decapeptyl, Ipsen Pharm o 3,75 mg de Gonapeptyl, Ferring). Después de la menstruación, todas las receptoras iniciaron la sustitución de estrógenos con una dosis diaria de 6 mg de E2 oral (EV; Progynova, Schering España) ó 150 mg/48 horas de E2 transdérmico (Evopad). A los 10 días, se evaluaron los niveles de E2 y P4 en suero, y se midió el grosor endometrial. La administración de la P4 (800 mg/día por vía vaginal de Progeffik, Effik Laboratorios, Madrid o Orgalutran, MSD) se inició el día después de la donación de ovocitos. Para ciclos con embriones criopreservados, la transferencia se programó 3 ó 5 días después del inicio de la P4.

3. Punción ovárica, recuperación de ovocitos y decumulación

La recuperación de los ovocitos se realizó mediante la ayuda de ecografía transvaginal, bajo sedación, en condiciones asépticas y 36 horas después de la administración de la hCG. A la sonda ecográfica se le acopló una aguja de punción ovárica (Kitazato Medical) con la que se puncionaron los folículos uno a uno aspirando su contenido. Para ello, se requirió la ayuda de una presión negativa de 180 mm de Hg que ejercía una bomba de vacío conectada a un pedal con el que se controló la presión de aspiración.

La aguja se conectó a un tubo previamente calentado a 37°C (Falcon 2057, BectonDickinson) que recogió el contenido del líquido folicular. Posteriormente, este se vertió en placas petri precalentadas para la recuperación de los complejos cúmulo-corona-ovocito. Estos, una vez localizados, se aspiraron con una pipeta Pasteur y se depositaron en una placa que contenía Gamete Medium (COOK™, Sydney, Australia) para proceder a su lavado. Finalmente, estos complejos se cultivaron en piscinas de 4 mL de Fertilization Medium (Cleavage Medium, COOK™, Sydney, Australia) a 5,5% de CO₂ y 37°C antes del proceso de decumulación, que se realizó a las 2 horas si los ovocitos iban a ser vitrificados o a las 4 horas si iban a ser microinyectados en fresco.

Los ovocitos fueron decumulados mediante una breve introducción en una solución de hialuronidasa (40 IU/ml) empleando capilares de diferente diámetro hasta la total eliminación de las células de cumulus. Sólo los ovocitos MII se vitrificaron o microinyectaron.

4. Vitrificación y desvitrificación

La vitrificación y desvitrificación de ovocitos y embriones se realizó con el método Cryotop® descrito por Kuwayama (Kuwayama *et al.*, 2005b) y comercializado en Europa por Dibimed Biomedical Supply.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. El método Cryotop®

Este dispositivo consiste de una fina tira transparente donde se cargan las muestras, de 0,4 mm de anchura, 20 mm de longitud y 0,1 mm de grosor, unida a un mango plástico resistente al NL (Figura 15). Su diseño permite realizar la carga de las muestras con un volumen mínimo de medio de vitrificación (0,1 μ L), proporcionando unas altas tasas de enfriamiento (23000°C/min) y calentamiento (42000°C/min).



Figura 15. Cryotop®.

4.2. Equipos y materiales

- Cabina de flujo laminar no calefactada
- Lupa estereoscópica binocular
- Banco de vapor de nitrógeno CBS V1500 (Custom Biogenic Systems, Michigan, E.E.U.U)
- Guantes de seguridad para manipulación de nitrógeno líquido (Cryo-Gloves, Tempshield E.E.U.U)
- Gafas de protección criogénica (Ref. 73520-655 Air Liquide)
- Impresora de etiquetas (Brady®, E.E.U.U)
- Vaso Dewar (Thermo-Flask®, Sigma-Aldrich Inc Misuri, E.E.U.U)
- Pinzas
- Cronómetro; modelo T-590 (T2291-1EA; Quarz Digital Timer)
- Cubeta de poliestireno (Cooling rack and stainless box®)
- Pipeta automática Pipet-lite® (LTS Pipet L-300; Rainin)
- Flexipet® Adjustable Handle Set (Cook Medical)
- Capilares 140-170 μ m de diámetro (Cook Medical)
- Stripper® Tips (MXL3-200/MXL3-275) (Origio Mid Atlantic Devices)
- Placa 6 pocillo fondo cónico Reproplate (Kitazato BioPharma)
- Placas Falcon 1008 (Falcon®, Becton Dickinson Labware, Flanklyn Lakes, Nueva Jersey, EE.UU)
- Cryotop®s de varios colores (Kitazato BioPharma)

4.3. Soluciones

Las soluciones que se utilizaron para vitrificar y desvitrificar son de fabricación comercial (Kitazato BioPharma) (Figura 16):

Soluciones de vitrificación

- Solución de lavado; Basic Solution (BS): medio tampón HEPES TCM199 (M199) suplementado con 0,06 mg/ml de HPC. Solo se usa en la vitrificación de ovocitos.
- Solución de equilibrio; Equilibration Solution (ES): 7,5% de EG; 7,5% de DMSO en solución BS.
- Solución de vitrificación; Vitrification Solution (VS): 15% de EG; 15% de DMSO en solución BS.

Soluciones de desvitrificación

- Solución de descongelación, Thawing solution (TS): 0,1 M de trealosa en solución de lavado (WS)
- Solución de dilución; Dilution Solution (DS): 0,5 M de trealosa en solución WS.
- Solución de lavado; Washing Solution (WS): medio tampón HEPES TCM199 (M199) suplementado con 0,06 mg/mL HPC.



Figura 16. T

4.4. Procedimiento

4.4.1. Procedimiento de vitrificación

IMTambiente (22-25°C). Las soluciones se atemperaron al menos 1 hora antes de realizar el procedimiento. Antes de comenzar, se preparó la cabina con todo el material necesario y se llenó con NL el recipiente de acero inoxidable acoplado al contenedor de poliestireno.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo de vitrificación se divide en 4 etapas: equilibrado, vitrificación, carga y sumersión en NL. Solo la etapa de equilibrado es diferente entre ovocitos y embriones.

Equilibrado para los ovocitos

- Se pipetea 20 μ L de BS en el primer pocillo y 300 μ L de VS en el segundo y tercer pocillo de la placa Reproplate (Figura 17).



Figura 17. Placa Reproplate.

- Se aspiran los ovocitos (hasta un máximo de 16) con un capilar de 140 μ m y se colocan en el fondo del pocillo de BS con el mínimo medio posible. Se compara el ancho del espacio perivitelino y el grosor de la zona pelúcida.
- Se agregan 20 μ L de ES de forma suave alrededor de la gota BS anterior. Se espera 3 minutos.
- Se agregan otros 20 μ L de ES suavemente y se espera 3 minutos.
- Se agregan 240 μ L de ES suavemente y se espera entre 6-9 minutos. El equilibrio finaliza cuando el volumen de los ovocitos se recupera completamente (Figura 18).

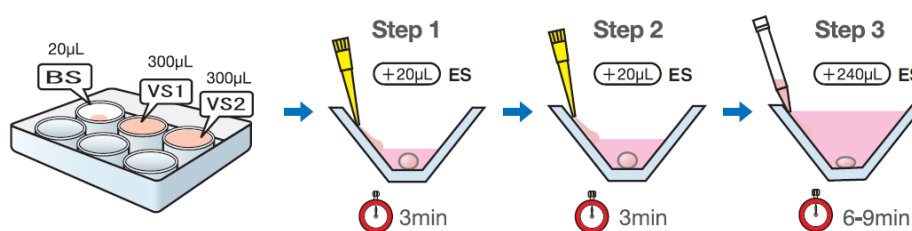


Figura 18. Proceso de equilibrado para la vitrificación de ovocitos.

Equilibrado para los blastocistos

- Se pipetea 300 μ L de ES en el primer pocillo y 300 μ L de VS en el segundo y tercer pocillo de la placa Reproplate.
- Se aspira el blastocisto con un capilar de 275 μ m y se coloca en la superficie del pocillo de ES con el mínimo medio posible. Se espera entre 12-15 min (Figura 19).

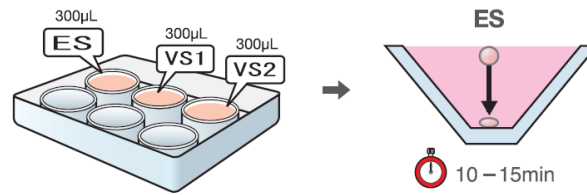


Figura 19. Proceso de equilibrado para la vitrificación de blastocistos.

Los siguientes pasos son comunes para ovocitos y embriones.

Vitrificación

- Se aspiran los ovocitos (4 como máximo) o el blastocisto y se colocan en la superficie del pocillo de VS con el mínimo medio posible. Para los ovocitos se utiliza un tamaño de capilar de 140 µm y para los blastocistos de 200 µm.
- Se fija el cronómetro a 30 s.
- Se aspira la solución ES que rodea a los especímenes y se deshecha. A continuación, estos se aspiran y se llevan al fondo del pocillo. Mientras se lavan por diferentes zonas del pocillo, se continúa eliminando los restos de solución ES de alrededor, fácilmente distinguibles por la diferencia de densidad.
- Se aspiran los ovocitos o el blastocisto y se coloca en la base del segundo pocillo de VS. Durante 30 segundos, se lavan por todo el pocillo como se ha descrito anteriormente (Figura 20).

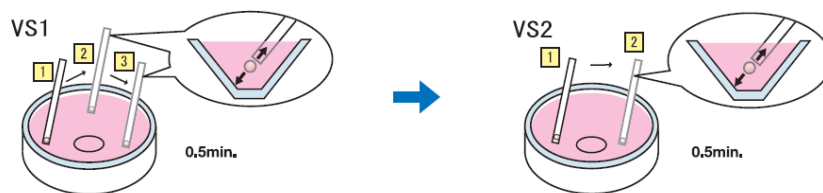


Figura 20. Lavados durante el paso por la solución VS.

Carga

- Se aspiran los ovocitos o el blastocisto con la punta del capilar con el mínimo medio posible.
- Se depositan en la lengüeta del Cryotop® bajo la lupa binocular.
- Se aspira el exceso de medio (Figura 21).

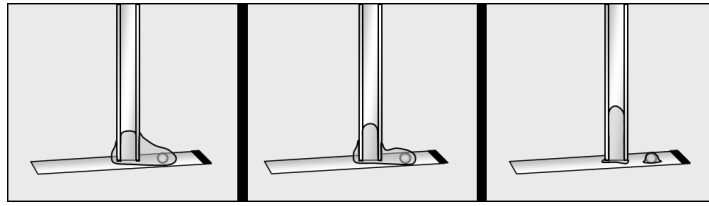


Figura 21. Procedimiento de carga en el Cryotop®. Figura extraída de Remohí *et al.*, 2008.

Sumersión en NL

- Una vez aspirado el exceso de medio, se sumerge el Cryotop® rápidamente en el NL.
- Se mueve enérgicamente para evitar la formación de burbujas.
- Se coloca la pajuela protectora

4.4.2. Procedimiento de desvitrificación

El protocolo de desvitrificación es idéntico para ovocitos y para embriones. La desvitrificación se realizó a temperatura ambiente. Las soluciones DS y WS fueron atemperadas al menos 1 hora previa al procedimiento y la solución TS fue calentada a 3a l menos 7°C durante el mismo tiempo.

El protocolo de desvitrificación se divide en 3 etapas: desvitrificación, dilución de los ACP y lavado. Antes de empezar con el procedimiento se preparó la cabina con el material necesario, se llenó la cubeta con NL y se recuperaron las muestras del banco de almacenamiento, las cuales se mantuvieron sumergidas en el NL hasta el momento de su desvitrificación.

Desvitrificación

- Se pipetea 300 µl de la solución DS en el primer pocillo de la Reproplate y 300 µl de la solución WS en el segundo y tercer pocillo.
- Se retira la pajuela protectora del Cryotop®.
- Se vierte el contenido de la solución TS en una placa Falcon 1008 previamente calentada a 37°C. A continuación, con un movimiento rápido y directo, se sumerge el Cryotop® en la placa de TS situada bajo la lupa estereoscópica. Inmediatamente después se visualizan los especímenes, dejando que se desprendan por si solos de la lengüeta. Si pasados 40 segundos no se desprenden, se desliza el Cryotop® suavemente por el fondo de la placa.

- Después de 1 minuto, se aspiran los ovocitos o blastocistos del TS y se continúa aspirando solución TS dentro del capilar (aprox. 1 cm de columna en el capilar).

Dilución de los CPAs

- Se transfieren las muestras al fondo del pocillo con DS, asegurándonos de verter primero la columna de TS previamente aspirada. Se espera 3 min.
- Se aspiran los ovocitos o blastocistos junto con una columna de 1 cm de solución DS.

Lavado

- Se transfieren las muestras al fondo del primer pocillo de WS, asegurándonos de verter primero la columna de DS. Se espera 5 minutos.
- Se aspiran los ovocitos/blastocistos y se colocan en la superficie del segundo pocillo de WS. Tras 1 minuto se transfirieron a su placa de cultivo.

4.5. Almacenaje

Para el almacenaje se utilizaron bancos en fase vapor de nitrógeno. Estos tanques están provistos de una cámara interior con diversos departamentos donde se almacenan las muestras (Figura 22). En las paredes de esta cámara se mantiene el NL, que enfría las muestras por conducción, a través de la superficie interna, y por convección, a través de la circulación de vapor cuando se activa el llenado del tanque (Cobo *et al.*, 2010b). La excepcional uniformidad de temperatura permite utilizar todo el tanque de almacenamiento, logrando temperaturas por debajo de -180°C en el nivel superior, y -195°C en la parte inferior. Las muestras se pueden manipular en rangos de temperatura seguros gracias al área de trabajo ubicada en la parte superior del área de almacenamiento, evitando así cualquier riesgo de calentamiento accidental. De hecho, siempre que se procede a extraer y guardar muestras hay que tener la precaución de mantener la temperatura del Cryotop[®], puesto que una subida a -130°C podría ocasionar la cristalización de las muestras.

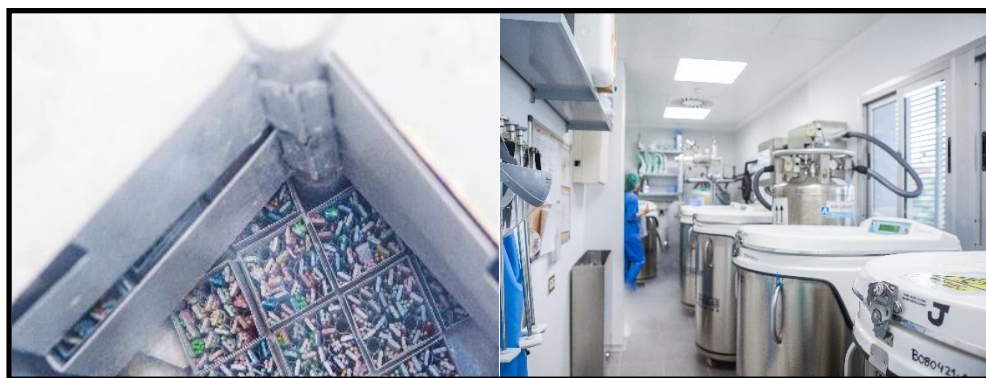


Figura 22. Almacenaje en tanques criogénicos. A) Disposición de las muestras en el área de almacenamiento del tanque de vapor de N₂; B) Sala de tanques criogénicos.

4.6. Evaluación de la supervivencia

La evaluación de la supervivencia ovocitaria se realizó inmediatamente después de la desvitrificación. Para ello se observó la integridad de la membrana plasmática y de la ZP, así como la ausencia de signos de degeneración en el citoplasma.

La supervivencia de los blastocistos se evaluó de acuerdo con la apariencia morfológica de los mismos, teniendo en cuenta la integridad y la ausencia de degeneración del TE y la MCI. Además, se evaluó la capacidad de re-expansión tras la desvitrificación.

5. Obtención y procesamiento de las muestras de semen

Las muestras de semen utilizadas fueron obtenidas mediante masturbación y transportadas al laboratorio en un periodo de tiempo no superior a una hora. En algunos casos, estas fueron congeladas previamente al tratamiento, y en otros, se utilizó la muestra fresca recogida el mismo día del procedimiento. Una vez allí, se incubó durante un periodo mínimo de 15 minutos entre 20 y 37°C hasta obtener la completa licuefacción. Tras este periodo, se procedió a su evaluación, empleando los criterios de la OMS, que tienen en cuenta el volumen, la concentración, la movilidad y la morfología de la muestra.

Posteriormente, la muestra seminal fue procesada mediante la capacitación espermática, técnica que consiste en una selección de aquellos espermatozoides con mejor movilidad. Para ello, se elimina el plasma seminal (que contiene las prostaglandinas e inhibidores de la movilidad) y los espermatozoides inmóviles, junto con las células inmaduras y detritos.

La capacitación espermática se puede realizar mediante dos técnicas: swim-up o centrifugación en gradientes de densidad. El swim-up se basa en que solo los espermatozoides con buena movilidad pueden ascender al sobrenadante. Es una técnica muy sencilla y permite

una buena recuperación en las muestras normozoospermicas. El fundamento de los gradientes de densidad se basa en la selección de los espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presentan los gradientes de densidad de 90 y 45% (Puresperm NidacomR, International AB, Suecia) o polímero similar y llegar hasta el fondo del tubo, además de actuar como filtro para el plasma seminal, células redondas, detritos y aquellos espermatozoides con movilidad no progresiva.

6. ICSI

Todos los ovocitos fueron inseminados mediante la técnica ICSI. Para su realización se empleó un microscopio invertido con óptica Hoffman (IX7 Olympus) en 400x de magnificación con platina calefactada y un equipo de micromanipulación, con una pipeta de sujeción (Precision Holding Pipette COOK™, Sydney, Australia) y una pipeta de microinyección (Precision Microinjection Pipette COOK™, Sydney, Australia).

Se utilizaron placas de microinyección con gotas de medio de cultivo con HEPES (Gamete Medium, COOK™, Sydney, Australia) para cada uno de los ovocitos a microinyectar y gotas de PVP, todas ellas cubiertas con aceite mineral testado para embriones.

Una vez colocadas las micropipetas, se seleccionaron los espermatozoides con mejor movilidad y morfología y se inmovilizaron, fracturando su cola mediante un golpe seco en el tercio proximal de esta con ayuda de la pipeta de microinyección. Posteriormente, se aspiró el espermatozoide con la pipeta de microinyección, y se colocó el ovocito correctamente, con el CP en la parte superior a las doce horarias o en la parte inferior a las 6 horarias, sujetándolo con la pipeta de holding. Esta colocación es necesaria para asegurarnos de no dañar el huso meiótico durante el proceso. Después de asegurarnos que tanto la pipeta como la membrana del ovocito estaban enfocadas, se presionó suave y gradualmente sobre la ZP, que fue traspasada, y posteriormente sobre la membrana del ovocito, procurando que se perfilara un cono alrededor de la pipeta, debido a la resistencia ejercida por la membrana celular. A continuación, se aspiró citoplasma ovocitario hasta que notamos la rotura de la membrana, momento en el que lo introdujimos de nuevo suavemente junto con el espermatozoide, procurando no introducir PVP en el interior del ovocito. Por último, los ovocitos microinyectados se lavaron y se colocaron en placas EmbryoSlide® (UnisenseFertiTech, Aarhus, Denmark) con 20 µl de medio de cultivo pre-equilibrado Cleavage Medium (Cook™, Sydney, Australia) cubierto con 1,2 mL de aceite mineral y colocados en el EmbryoScope® en condiciones estables de cultivo (37°C y 5,5% de CO₂) hasta día 3 de desarrollo (72 horas post-ICSI) en el que, algunos embriones fueron transferidos y otros se dejarían en cultivo hasta el

día 5 de desarrollo (120 horas post-ICSI), después de cambiarles el medio por CCM™ Medium (Vitrolife).

7. Sistema de análisis de imagen.

Como sistema *time-lapse* se utilizó el EmbryoScope® que consiste en un incubador con un sistema de captura de imágenes integrado que permite la visualización continua del desarrollo embrionario sin alterar las condiciones de cultivo. Está constituido por una cámara CCD monocroma, un dispositivo Leica 20x con un objetivo de contraste de óptica Hoffmann LWD 0.40, iluminación de tipo LED de 635 nm que permite la adquisición de imágenes de alta calidad en intervalos de alrededor de 10 minutos y a través de 7 planos focales. Estas imágenes se almacenan en una base de datos para su análisis a través del *software* Embryoviewer. Además, con una exposición diaria a la luz inferior a los 50 segundos, hecho que garantiza un riesgo prácticamente nulo de foto-oxidación embrionaria (Figura 23).



Figura 23. EmbryoScope®.

La idea original era usarlo para medir el consumo de O_2 como un parámetro adicional para valorar la calidad embrionaria en bovinos (Ramsing and Callesen, 2006). Como además de estas mediciones se adquirirían imágenes del desarrollo embrionario, pronto se observó que los tiempos precisos de las divisiones celulares tenían una gran relevancia en la viabilidad embrionaria. De esta forma, se decidió enfocar este dispositivo a la captura de imágenes para la valoración de los embriones, y en 2009 se introdujo en el mercado después de obtener el marcado CE.

7.1. Preparación de placas: EmbryoSlides®

El Embryoscope® precisa de unas placas especialmente diseñadas para el cultivo embrionario, testadas para su uso clínico y de un solo uso, denominadas EmbryoSlides® (Figura 24). Están diseñadas para incluir 12 embriones, cultivados individualmente en 12 pocillos. Cada pocillo va numerado para facilitar la monitorización embrionaria.



Figura 24. Placas EmbryoSlide®.

La preparación de placas se realizó el día anterior a su uso para asegurar el completo equilibrado de gases, utilizando una cabina a temperatura ambiente (Figura 25). El protocolo usado fue el siguiente:

- Se llenó cada pocillo con 28 μ L de medio de cultivo.
- Se eliminaron las burbujas, si las hubiera, para que la toma de imágenes no se viera afectada (se recomienda usar medio de cultivo y aceite mineral previamente atemperado para evitar la formación de burbujas).
- Inmediatamente después, para evitar la evaporación, se añadió 1,2 mL de aceite mineral.
- Se dejaron a 37°C y 5,5% de CO₂ hasta su uso.

El día de su utilización, una vez cargados los ovocitos o embriones, se colocó la placa en el EmbryoScope®. Tras añadir los parámetros necesarios asociados a cada paciente, como el nombre y apellidos, el número de historia clínica, el número de protocolo y la hora de ICSI o desvitrificación embrionaria (las cuales marcarán el parámetro t₀), el sistema automáticamente empezó con la recolección de imágenes.

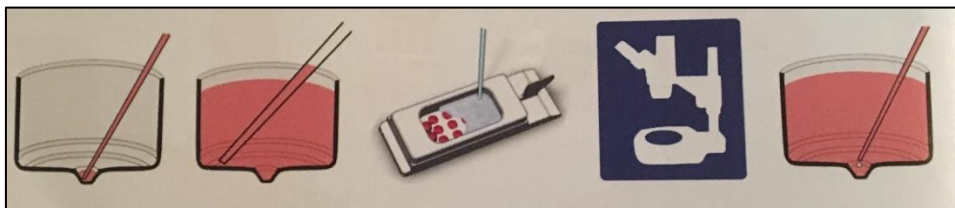


Figura 25. Preparación de placas EmbryoSlides®. Figura extraída de Meseguer, 2016.

7.2. Software integrado en el Embryoscope®: El EmbryoViewer

El EmbryoScope® lleva integrado un software para el análisis llamado EmbryoViewer. Con las herramientas que proporciona, es posible la anotación de todos los parámetros morfológicos y morfocinéticos que acontecen durante el desarrollo de cada embrión. Además,

MATERIALES Y MÉTODOS

el Embryoviewer no solo permite el análisis de los embriones, sino que ofrece la posibilidad de comparar entre ellos y seleccionar el más óptimo para la transferencia. Al registrar los eventos del desarrollo embrionario, el software otorga una puntuación objetiva del potencial de implantación a cada embrión, utilizando un algoritmo previamente definido. Además, proporciona otras herramientas capaces de generar videos del desarrollo embrionario, exportación de datos, informes para los pacientes y control de los parámetros de incubación.

El panel de división celular permite una visión general del desarrollo de cada embrión (Figura 26), de tal forma que observando la cohorte embrionaria de una paciente es posible realizar una rápida evaluación del resultado del ciclo.

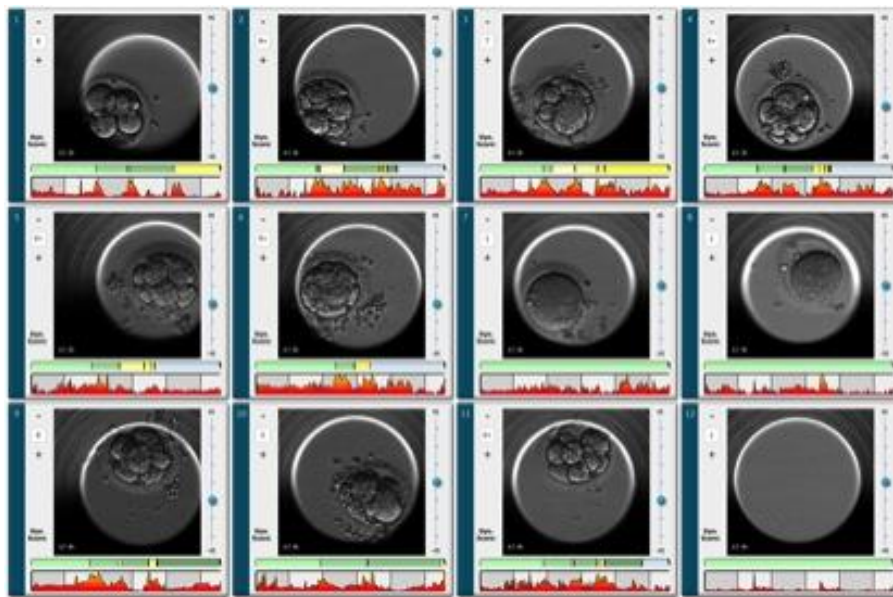


Figura 26. Panel de división celular del EmbryoViewer. Figura extraída de Meseguer, 2016.

8. Transferencia embrionaria y determinación de la gestación

La transferencia embrionaria se realizó por vía vaginal guiada con ecografía transabdominal. Mediante un catéter de transferencia acoplado a una jeringuilla de insulina de 1 mL se introdujeron los embriones a través del canal cervical hasta la cavidad uterina.

La existencia de gestación se valoró mediante la determinación en sangre de la β -hCG. Esta prueba se realizó 13 días después de las transferencias en día 3 de desarrollo, y 11 días después de las transferencias en estadio de blastocisto.

9. Estudio I: Impacto de la vitrificación de ovocitos en la cinética embrionaria

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la vitrificación de ovocitos sobre los parámetros morfocinéticos de embriones generados después de los procedimientos de vitrificación y desvitrificación, comparados con valores que presentan los embriones desarrollados a partir de ovocitos frescos.

9.1. Diseño experimental

En este estudio retrospectivo de cohortes se seleccionaron todos los ciclos de donación de ovocitos llevados a cabo entre septiembre de 2012 y septiembre de 2015, cuyos embriones habían sido cultivados en el EmbryoScope® y la transferencia se había realizado en ese mismo ciclo. Se incluyeron un total de 1990 ciclos (13730 embriones) repartidos en dos grupos de la siguiente forma: 1359 ciclos de ovocitos frescos (9936 embriones) y 631 ciclos de ovocitos vitrificados (3794 embriones) (Figura 27).

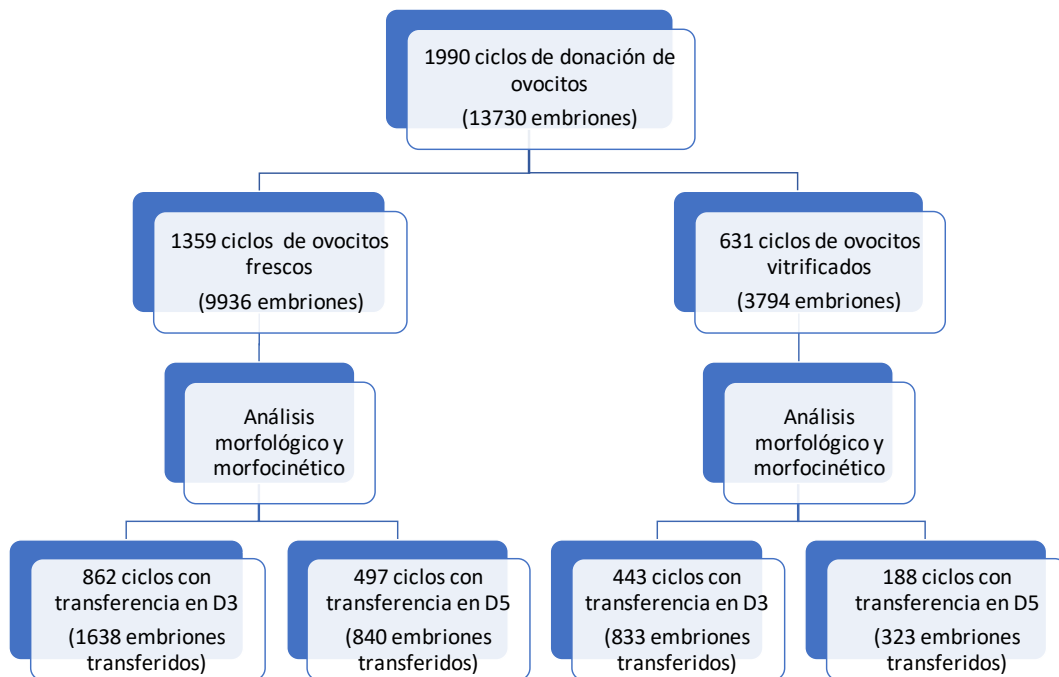


Figura 27. Distribución de ovocitos de los dos grupos de estudio.

En el grupo de los ovocitos frescos, la decumulación e ICSI se realizaron 4 horas después de la punción folicular. En el grupo de ovocitos vitrificados, el ICSI se realizó 2 horas después de la desvitrificación.

Los ovocitos, en ambos grupos, una vez microinyectados se colocaron en el EmbryoScope®, y el desarrollo embrionario se monitorizó hasta el día de la transferencia. El

MATERIALES Y MÉTODOS

número de embriones a transferir y el día de la transferencia dependió de la calidad embrionaria, la historia clínica y la conveniencia de los pacientes (Figura 28).

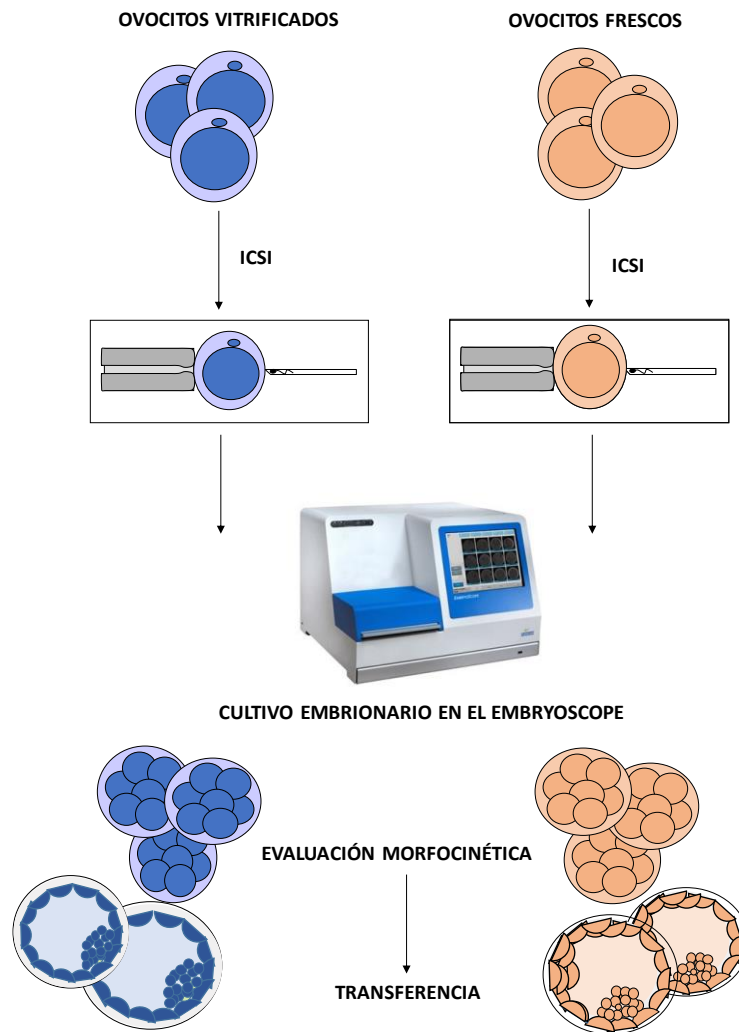


Figura 28. Desarrollo del estudio de cohortes.

Se excluyeron del análisis aquellos casos en los que factores independientes de la vitrificación ovocitaria pudieran influir en el desarrollo embrionario y los resultados clínicos como:

- Presencia de patología uterina (miomas, adenomiosis, malformaciones uterinas adquiridas o congénitas), Endometriosis, Hidrosalpinx, historia de enfermedades sistémicas o trastornos endocrinos o metabólicos significativos, historia de pérdida gestacional recurrente y pacientes que recibieron medicación concomitante que pudiera interferir con los objetivos del estudio.

- Factor masculino severo (<1 millón de espermatozoides móviles progresivos en el eyaculado) o toda muestra seminal obtenida a través de tratamiento quirúrgico.

9.2. Parámetros morfocinéticos y variables analizadas

Las imágenes de cada embrión fueron analizadas retrospectivamente con el Embryoviewer. Todas las características tanto cinéticas como dinámicas del desarrollo embrionario fueron anotadas junto con los tiempos exactos en los que acontecían. El tiempo exacto para cada división embrionaria fue calculado como horas después del ICSI. Se consideró que una división se había completado cuando las nuevas blastómeras se separaron completamente por membranas claramente definidas. El registro de la cinética embrionaria se realizó desde la primera división celular hasta el estadio de blastocisto (Figura 29). Los parámetros morfocinéticos analizados incluyeron:

- **t2:** tiempo de la división a dos células
- **t3:** tiempo de la división a tres células
- **t4:** tiempo de la división a cuatro células
- **t5:** tiempo de la división a cinco células
- **tM:** tiempo de compactación o formación de mórula
- **tB:** tiempo para la formación de un blastocisto con cavidad blastocélica.
- **tEB:** tiempo para la formación de un blastocisto expandido.
- **tHB:** tiempo para la formación de un blastocisto eclosionado.

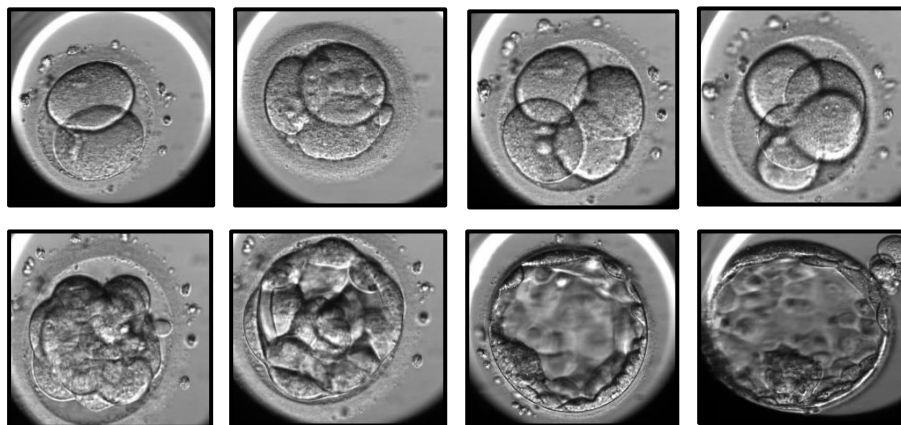


Figura 29. Parámetros morfocinéticos directos analizados. a) t2; b) t3; c) t4; d) t5; e) tM; f) tB; g) tEB; h) tHB

A partir de estos resultados se obtuvieron otros parámetros indirectos relacionados con la duración de los ciclos celulares:

- **cc2** (t3-t2): duración del segundo ciclo celular.

- **S2 (t4-t3):** sincronía del segundo ciclo celular, es decir, en la transición desde un embrión de 3 células a un embrión de 4 células.

Se calculó el porcentaje de embriones incluidos en los rangos de tiempo óptimos definidos previamente por Meseguer (Meseguer *et al.*, 2011) para los parámetros incluidos en el modelo. Estos intervalos se definieron de la siguiente manera: t5, 48,8–56,6 h; s2 (t4 t3), <0,76 h, y cc2, <11,9 h. También se identificaron los embriones que cumplían alguno de los siguientes criterios de exclusión propuestos por el modelo: tamaño desigual de blastómeras en el estadio de 2 células, multinucleación en el estadio de 4 células, y división abrupta del cigoto, de 1 a 3 células (cc2 <5 h).

9.3. Categorías morfocinéticas

Todos los embriones se clasificaron de acuerdo al modelo de selección jerárquico publicado por Meseguer (Meseguer *et al.*, 2011), basado en las correlaciones entre los parámetros morfocinéticos y la implantación embrionaria (Figura 30). Este modelo consideró el parámetro t5 como el más predictivo, seguido de s2. De este modo, los embriones se asignaron a 4 categorías con decreciente potencial de implantación, desde A hasta D.

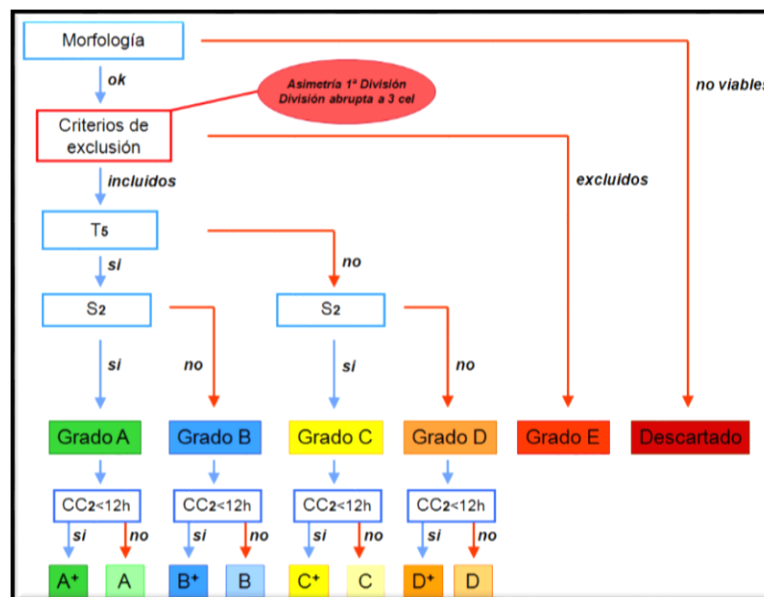


Figura 30. Modelo de selección morfocinético propuesto por Meseguer *et al.*, 2011.

De esta forma, si el valor t5 de un embrión estaba dentro del rango óptimo, el embrión era clasificado como A o B, según si el valor s2 estaba dentro o no del rango óptimo, respectivamente. Si el valor t5 estaba fuera del rango óptimo, el embrión se clasificó como C o D, según si el valor de s2 estaba dentro o fuera del rango óptimo, respectivamente. Cuando se

consideró el parámetro cc2, el tercero más predictivo, los embriones se clasificaron en 9 categorías, desde A+ hasta D.

Los embriones que cumplieron alguno de los siguientes criterios se clasificaron como E: tamaño desigual en estadio de 2 células, multinucleación en el estadio de 4 células, y división abrupta del cigoto, de 1 a 3 células.

Las variables clínicas analizadas en este estudio fueron las siguientes:

- **Tasa de implantación;** definida como el número de sacos gestacionales detectados mediante ecografía transvaginal dividido por el número de embriones transferidos.
- **Tasa de gestación clínica;** confirmada por la detección de un saco embrionario durante exploración transvaginal más allá de las 5 semanas.
- **Tasa de gestación evolutiva;** definida como la presencia de un saco gestacional con latido cardíaco fetal observado en exploración transvaginal a las 12 semanas de gestación.
- **Tasa de recién nacido vivo;** definida como feto nacido vivo más allá de las 22 semanas de embarazo.

9.4. Análisis estadístico

Para el análisis de resultados, en primer lugar, se exportaron todos los datos procedentes del EmbryoScope® (análisis morfocinético de los embriones) de aquellos ciclos seleccionados para el estudio, y se enlazaron con una base de datos del IVI que incluía los resultados clínicos de cada uno de los ciclos y la evaluación morfológica de los embriones realizada diariamente.

Los parámetros morfocinéticos presentaron una distribución normal y para comparar los valores medios de los mismos entre los ovocitos frescos y vitrificados, se utilizó un análisis de varianza que incluyó los cálculos de los intervalos de confianza al 95%, considerando la presencia de significación estadística cuando el valor de $p < 0.05$. Para la comparación de proporciones y sus diferencias entre los embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados se usó la prueba chi cuadrado, incluyéndose los intervalos de confianza al 95%. El mismo tipo de pruebas estadísticas se realizaron para analizar los valores clínicos y sus diferencias entre los ciclos donde se utilizaron ovocitos frescos o vitrificados.

Estos análisis se realizaron con el uso del paquete estadístico SPSS (SPSS inc., Chicago IL; Statistical Package for the Social Sciences) versión 22.0.

10. Estudio II. Análisis de la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados

El objetivo de este estudio fue describir la dinámica morfológica de blastocistos desvitrificados e identificar nuevos marcadores objetivos y cuantificables capaces de predecir la implantación. Posteriormente, utilizando los parámetros más predictivos, se desarrolló un algoritmo jerárquico subdividiendo los blastocistos desvitrificados en diferentes categorías con decrecientes potenciales de implantación. Finalmente, se validó el modelo utilizando otro set de embriones.

10.1. Diseño experimental

Este estudio retrospectivo incluyó a todas las pacientes de nuestro programa de donación de ovocitos que se habían sometido a ciclos de desvitrificación embrionaria y cuyos blastocistos desvitrificados se habían cultivado en el EmbryoScope®. Para el análisis, solo se seleccionaron los blastocistos KID, es decir, solo los embriones de aquellas transferencias en los que todos los blastocistos transferidos implantaron o en las que ninguno lo hizo (Alikani *et al.*, 2000). Los ciclos con una implantación parcial se excluyeron del estudio porque no fue posible determinar cuál de los dos embriones transferidos fue el que realmente implantó.

La elección del blastocisto para desvitrificar entre todos los de la cohorte se basó en la calidad morfológica que presentaron en el ciclo en fresco. Los blastocitos, una vez desvitrificados, se incubaron en el EmbryoScope® a 37°C, 5,5% de CO₂ y O₂ atmosférico, desde inmediatamente después de la desvitrificación (t0) hasta el momento de la transferencia (3,5–7 horas).

El estudio se dividió en 3 fases:

➤ **Fase 1: Identificación y análisis de las variables morfocinéticas relacionadas con la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados.**

En esta primera fase se identificaron variables morfocinéticas relacionadas con la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados que pudieran ser fácilmente medibles y cuantificables. Posteriormente, se tomaron medidas de cada una de ellas y se correlacionaron con las tasas de implantación. Además, un análisis adicional evaluó la relación existente entre la clasificación morfológica que tenían los blastocistos antes de la vitrificación con los resultados clínicos. Se incluyeron un total de 386 ciclos de desvitrificación con 528 blastocistos desvitrificados entre noviembre de 2014 y diciembre de 2015. Después de descartar los ciclos con implantación parcial, se analizaron 429 blastocistos KID provenientes de 335 transferencias.

➤ **Fase 2: Generación de un algoritmo para la implantación de blastocistos desvitrificados.**

En la segunda fase, a través de una regresión logística, se identificaron las variables anteriormente cuantificadas que fueron más predictivas de implantación. Con estos datos, se generó un algoritmo que permitía clasificar los blastocistos en diferentes categorías según su potencial de implantación. Los datos para desarrollar el nuevo algoritmo fueron obtenidos a partir de los 429 blastocistos KID.

➤ **Fase 3: Validación del algoritmo para la implantación de blastocistos desvitrificados**

El algoritmo fue validado utilizando otro set de embriones. Inicialmente, se incluyeron 246 ciclos de desvitrificación embrionaria, cuyos embriones se cultivaron en el EmbryoScope®, y que fueron realizados entre enero de 2016 y diciembre de 2016. De estos, 181 blastocistos provenientes de 215 ciclos presentaron implantación conocida y, por tanto, fueron los que se seleccionaron para el análisis. Los blastocistos fueron distribuidos en las diferentes categorías definidas por el algoritmo según los valores que presentaban los parámetros incluidos en el modelo.

La Figura 31 resume la distribución de embriones en cada una de las fases, así como los procedimientos realizados en cada una de ellas.



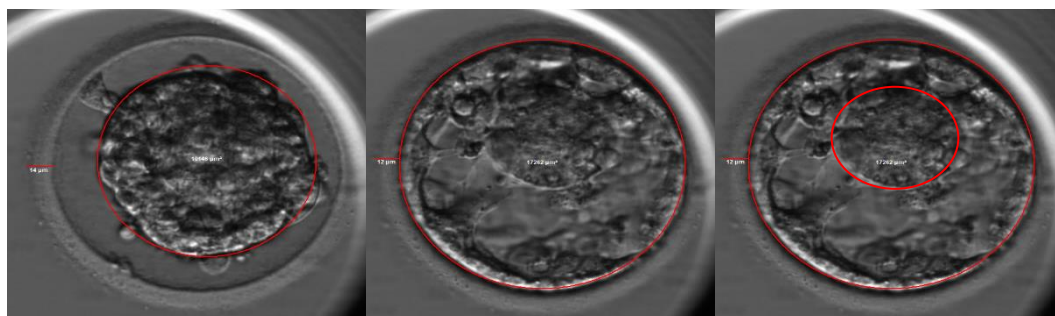
Figura 31. Fases del estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

10.2. Parámetros morfocinéticos y variables analizadas

Las imágenes de cada blastocisto desvitrificado se analizaron en el EmbryoViewer, utilizando las herramientas de dibujo disponibles. Esta aplicación permite tomar medidas de diferentes estructuras de los embriones relacionadas con el proceso de re-expansión y que, por tanto, podrían utilizarse como nuevos marcadores para la implantación embrionaria. Los parámetros que decidimos analizar incluyeron (Figura 32):

- **Grosor de la ZP** (μm) tanto después del calentamiento como antes de la transferencia (estos parámetros se definieron como el grosor de ZP inicial y final).
- **Área de los blastocistos** (μm^2) inicial y final.
- **Re-expansión post desvitrificación** ($A_f - A_i$), calculada como la diferencia entre el área final e inicial.
- **Tiempo de inicio de la re-expansión** (t_{iRE}) (min)
- **Presencia de colapso o contracción**; que se confirmó cuando se separó $\geq 50\%$ de la superficie TE de ZP (Figura 2 complementaria).
- **Área de ICM** (μm^2)



	Variable	Time	Value
1			
	Ellipse	1.9	8987 μm^2
	Line	1.9	18 μm
	Ellipse	5.7	9183 μm^2
	Line	5.7	18 μm
	No re-expansion	5.7	Non re-expand

Figura 32. Parámetros analizados. A) Grosor de la ZP y área del blastocisto inicial; B) Grosor de la ZP y área del blastocisto final; C) Área de la ICM; D) Re-expansión.

La variable clínica con la que se correlacionaron todos los parámetros morfocinéticos fue la tasa de implantación evolutiva, definida como el número de sacos gestacionales con

latido cardíaco fetal, detectados con ecografía en la semana gestacional 7-8, dividido por el número de embriones transferidos.

10.3. Evaluación de la morfología pre-vitrificación

La clasificación morfológica que tenían los blastocistos antes de la vitrificación se correlacionó con la tasa de implantación evolutiva del ciclo de desvitrificación. Estos blastocistos fueron clasificados de acuerdo con los criterios ASEBIR, los cuales se basan en: 1) tamaño, forma y compactación de la MCI; 2) grado de expansión del blastocelo; 3) estructura y número de células del TE (20, 21). La figura 33 resume esta clasificación.

D+5				
Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR	
Desde: "Iniciando la expansión" Hasta: "Eclosionando"	A	A	A	
		B	B	
		C	C	
		D	D	
	B	A	A	
		B	B	
		C	C	
		D	D	
	C	A	A	
		B	B	
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	D	C	C	
		A,B,C o D	D	
			C	
Mórula			D	

Categoría	Tamaño MCI (µm²)	Cohesión
A	3800-1900	Compacta
B	3800-1900	No compacta
C	1900	Indiferente
D	Signos de degeneración	
Excluidos	Degenerada	

Categoría	Descripción del Trofoectodermo
A	Homogéneo, cohesionado y muchas células
B	Homogéneo; menos células
C	Pocas células
D	Signos de degeneración
Excluidos	Degenerado

Figura 33. Esquema de la clasificación ASEBIR para blastocistos.

10.4. Análisis estadístico

Para evaluar la relación entre los parámetros analizados y la tasa de implantación, los datos cinéticos fueron convertidos de variables continuas a variables categóricas, así el parámetro de respuesta binaria fue “1” para la presencia de saco gestacional con latido fetal (embriones que consiguieron implantar) y “0” para la ausencia de saco (embriones que no implantaron).

Se realizó un análisis de varianza para evaluar cualquier diferencia significativa en los valores medios de cada parámetro morfológico incluido en el estudio. Por otra parte, se realizó un test de chi cuadrado para comparar datos categóricos, ya fuera de las variables categóricas (ej. Morfología embrionaria) o de las respuestas binarias (ej. Presencia de colapsos). Los datos se dividieron en cuartiles y se calculó el porcentaje de embriones que implantaron para cada cuartil. Posteriormente, para cada variable se definió un rango óptimo basado en los cuartiles con el mayor porcentaje de blastocistos implantados. Se consideró la presencia de significación estadística cuando el valor de $p < 0,05$.

Mediante un análisis de regresión logística que incluyó todos los parámetros estudiados, se seleccionaron los que tenían más predicción de implantación para generar un algoritmo para los blastocistos desvitrificados. La selección se hizo por el método de pasos adelante basado en la significancia estadística de la prueba *Wald*. Este método finalmente consideró solo las variables con valor predictivo y combinables entre sí en un modelo jerárquico. El efecto de la *Odd Ratio* para todas las variables generadas sobre la implantación se expresó en términos de intervalos de confianza al 95%. Se emplearon curvas ROC para evaluar el valor predictivo del algoritmo elaborado.

Una regresión logística adicional incluyó posibles factores de confusión (edad de las donantes, día de la vitrificación, IMC de la receptora y duración del cultivo) que podían interferir en la relación entre las variables del algoritmo y la tasa de implantación.

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SSPS (SPSS inc., Chicago IL; Statistical Package for the Social Sciences) versión 22.0.

IV. RESULTADOS

Estudio I. Impacto de la vitrificación de ovocitos en la cinética embrionaria
1. Características demográficas de las donantes y receptoras

La edad de las donantes de ovocitos fue similar en el grupo de ovocitos frescos y en el de vitrificados (26,2 vs. 26,4). La supervivencia ovocitaria en el grupo de ovocitos vitrificados fue del 94,5% (Figura 34).

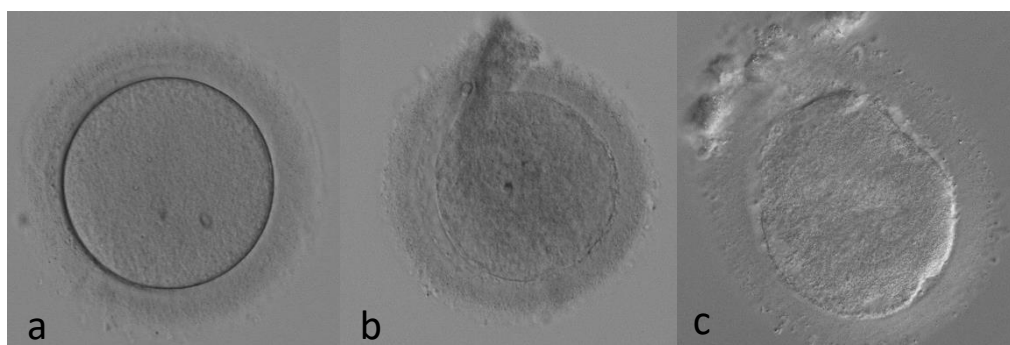


Figura 34. Evaluación de la supervivencia. a) Ovocito superviviente; b) y c) Ovocitos que no han sobrevivido al proceso de desvitrificación.

Las características de las donantes y receptoras se presentan en la Tabla 3, no observándose diferencias significativas en ninguna de ellas al comparar ambos grupos. Los parámetros seminales y las tasas de fecundación y llegada a estadio de blastocisto también fueron similares entre el grupo de ovocitos frescos y el de ovocitos vitrificados.

Tabla 3. Características demográficas de donantes y receptoras.

Donantes	Ovocitos frescos	Ovocitos vitrificados
Nº de ciclos de donación	1359	631
Edad (años)	26,2 (25,9 - 26,5)	26,4 (26,2 - 26,8)
Tasa de supervivencia (%)		94,5 (93,8 - 95,2)
Receptoras	Ovocitos frescos	Ovocitos vitrificados
Nº de receptoras	1359	631
Edad (años)	40,4 (40,1 - 40,6)	40,5 (40,3 - 40,7)
IMC (Kg/m ²)	25,0 (24,7 - 25,3)	21,0 (20,8 - 21,2)
Días de preparación endometrial	18,4 (18,0 - 18,8)	17,0 (16,5 - 17,5)
MII inseminados por paciente	10,5 (10,4 - 10,7)	10,1 (9,9 - 10,3)
Concentración espermática (%)	47,4 (46,6 - 48,2)	46,9 (45,2 - 48,6)
Movilidad espermática (%)	31,7 (30,6 - 32,8)	31,4 (30,2 - 32,5)

RESULTADOS

Tasa de fecundación (%)	78,0 (77,3 - 78,6)	77,1 (76,1 - 78,1)
Tasa de llegada a blastocisto en d5 (%)	73,8 (72,7 - 74,9)	70,2 (68,2 - 72,2)
Tasa de llegada a blastocisto en d6 (%)	79,8 (78,8 - 80,8)	80,9 (79,1 - 82,6)

2. Cinética del desarrollo en función del origen de los ovocitos

Los tiempos de división desde el estadio de dos células hasta la formación de blastocisto eclosionado se muestran en Tabla 4. En general, se observa que los embriones que se originaron a partir de ovocitos vitrificados muestran un retraso de una hora desde la primera división en dos células (t2) hasta el momento de blastulación (tB). Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el tiempo necesario para alcanzar estadios del desarrollo más avanzados como blastocisto expandido o eclosionado.

Tabla 4. Valores de cada uno de los parámetros morfocinéticos según el origen ovocitario.

Parámetro	Grupo	N	Media (h)	IC 95%	P valor
t2	Frescos	9935	27,7	27,6 - 27,8	<0,05
	Vitrificados	3793	28,7	28,5 - 28,9	
t3	Frescos	9746	37,8	37,6 - 37,9	<0,05
	Vitrificados	3697	38,9	38,5 - 38,9	
t4	Frescos	9546	40,2	40,1 - 40,3	<0,05
	Vitrificados	3585	41,4	41,2 - 41,7	
t5	Frescos	8789	50,5	50,3 - 50,7	<0,05
	Vitrificados	3141	51,7	51,4 - 52,1	
tM	Frescos	2594	86,6	86,1 - 87,1	<0,05
	Vitrificados	779	88,5	87,5 - 89,4	
tB	Frescos	1938	103,4	103,0 - 103,9	0,016
	Vitrificados	580	104,5	103,7 - 105,4	
tEB	Frescos	1045	114,4	113,8 - 114,9	0,466
	Vitrificados	325	114,8	113,7 - 115,9	
tHB	Frescos	164	114,9	113,4 - 116,4	0,196
	Vitrificados	59	116,9	113,8 - 120,0	
cc2	Frescos	9746	10,2	10,1 - 10,3	0,901
	Vitrificados	3697	10,2	10,0 - 10,4	
S2	Frescos	9546	2,6	2,5 - 2,6	<0,05
	Vitrificados	3585	2,9	2,7 - 3,1	

Respecto a los valores de la duración del segundo ciclo celular (cc2), los datos muestran que no existen diferencias significativas entre ambos grupos de ovocitos. Sin embargo, si hay

diferencias en la sincronía del segundo ciclo celular (s2), donde el grupo de ovocitos vitrificados presenta una mayor asincronía. La Figura 35 representa los valores de los parámetros analizados para cada uno de los grupos.

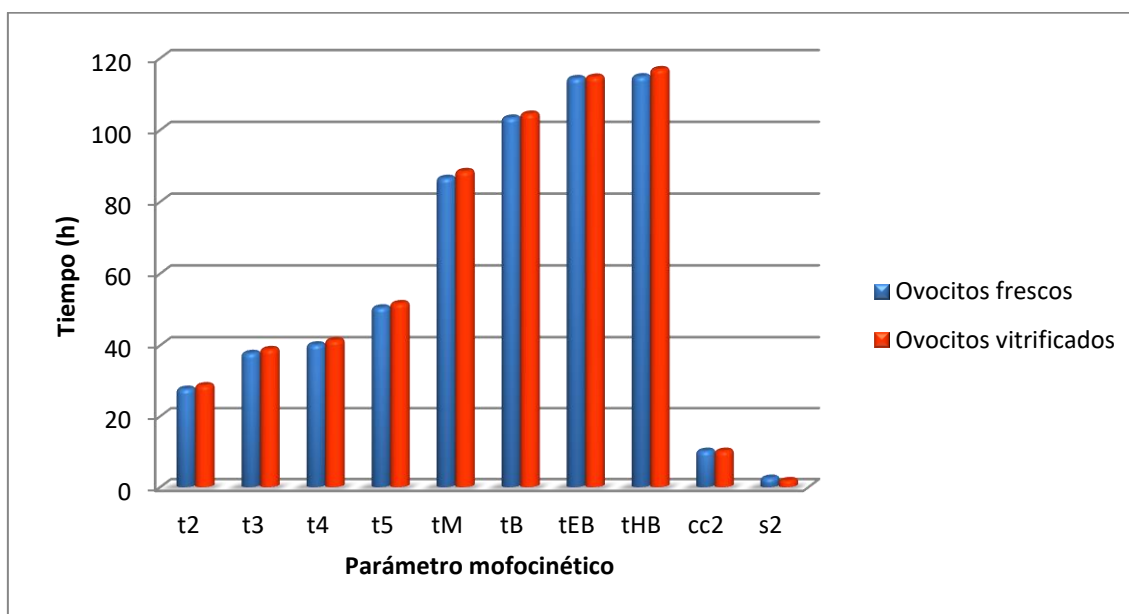


Figura 35. Representación de los valores de los parámetros morfocinéticos según el origen ovocitario.

3. Distribución de los embriones según los rangos óptimos definidos para las variables incluidas en el modelo

Se comparó la proporción de embriones cuyos tiempos de división embrionaria se encontraban dentro de los considerados como tiempos óptimos de división y que, por tanto, están relacionados con un mayor potencial de implantación (Figura 36). Los valores para t5 fueron 36,4% vs. 33,7% para el grupo de ovocitos frescos y para el de vitrificados respectivamente; los valores para s2 fueron 50,9% vs. 47,5% y para cc2 fueron 46,4% vs. 35,7% para cada uno de los grupos. Todas las proporciones fueron significativamente diferentes entre los embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados. La Figura 37 muestra el desarrollo embrionario en el grupo de ovocitos vitrificados.

RESULTADOS

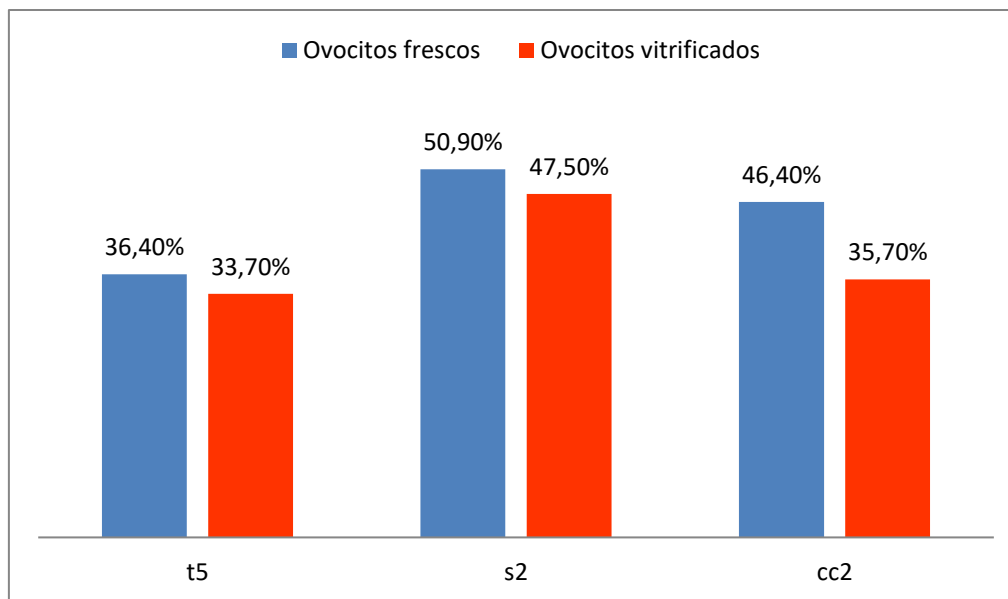


Figura 36. Distribución de los embriones en los rangos óptimos definidos.

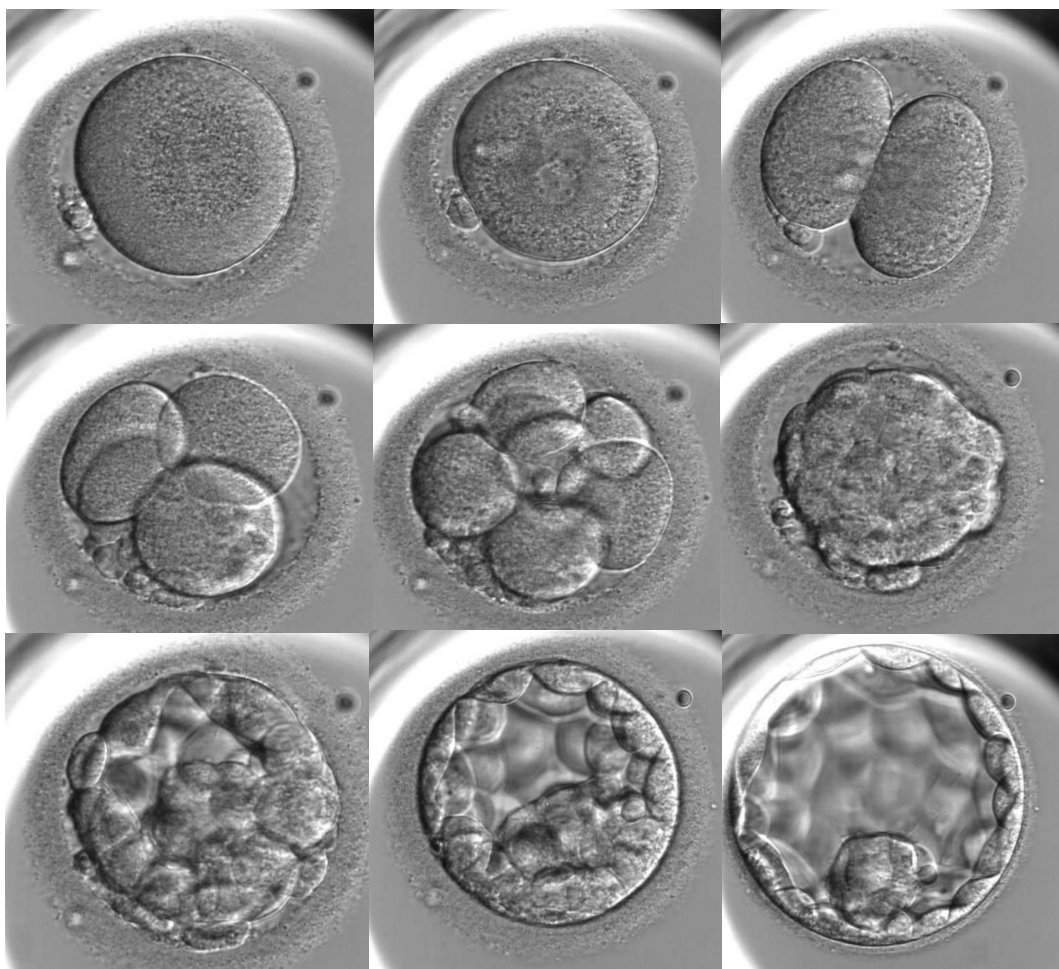


Figura 37. Desarrollo embrionario en el grupo de ovocitos vitrificados.

4. Clasificación embrionaria de acuerdo con el modelo jerárquico de selección

La clasificación embrionaria según el modelo de árbol jerárquico, mostró que la proporción de embriones asignados a cada categoría morfocinética (A-E) era similar entre el grupo de ovocitos frescos y el de vitrificados, no presentándose diferencias significativas entre ambos (Tabla 5). En resumen, la proporción de embriones para el grupo de ovocitos frescos y vitrificados respectivamente sería la siguiente: categoría A, 16,0% vs. 15,9%; categoría B, 12,7% vs. 11,0%; categoría C, 23,3% vs. 22,7%; categoría D, 16,7% vs. 19,6%; y categoría E, 31,4% vs. 30,9%.

Cuando los embriones se clasificaron utilizando el parámetro cc2 como tercera variable más predictiva, tampoco se encontraron diferencias significativas en la distribución de embriones entre las 9 categorías resultantes.

5. Resultados clínicos según día de transferencia en cada grupo

Los resultados clínicos según el día de la transferencia embrionaria se muestran en la Tabla 6. La tasa de implantación fue significativamente más baja cuando las transferencias se realizaron en día 3 de desarrollo respecto a las realizadas en estadio de blastocisto en ambos grupos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar la tasa de implantación en día 3 (36,2% vs. 36,1%) y en estadio de blastocisto (51,6% vs. 49,4%) entre el grupo de ovocitos frescos y vitrificados respectivamente.

Del mismo modo, la tasa de embarazo clínico y evolutivo, y la tasa de RNV fue similar entre ambos grupos (Tabla 6).

Tabla 5. Clasificación embrionaria según el modelo de árbol jerárquico.

CATEGORÍA MORFOCINÉTICA							
A		B		C		D	
A+		A-	B+	B-	C+	C-	E
Frescos	1404 (16,0%)		1120 (12,7%)		2038 (23,2%)		2756 (31,4%)
Vitrificados	498 (15,9%)		344 (11,0%)		712 (22,7%)		972 (30,9%)
A+		A-	B+	B-	C+	C-	E
Frescos	929 (10,6%)	475 (5,4%)	739 (8,4%)	381 (4,3%)	1255 (14,3%)	783 (8,9%)	2756 (31,4%)
Vitrificados	297 (9,5%)	201 (6,4%)	222 (7,1%)	122 (3,9%)	315 (10,0%)	397 (12,6%)	972 (30,9%)

Tabla 6. Resultados clínicos según el día de transferencia embrionaria.

	Ovцитos frescos				Ovцитos vitrificados			
	Transferencia en día 3		Transferencia en blastodisto		Transferencia en día 3		Transferencia en blastodisto	
Nº de ciclos	862		497		443		188	
Nº de transferencias	1638		840		833		323	
Embriones transferidos (media)	1,9		1,69		1,88		1,72	
Tasa de implantación (%)	36,2 (33,8 - 38,7)		51,6 (48,1 - 55,1)		36,1 (32,3 - 39,9)		49,4 (43,2 - 55,5)	
Tasa de embarazo clínico (%)	51,8 (48,6 - 54,9)		66,3 (62,3 - 70,2)		50,7 (45,8 - 55,4)		63,9 (56,9 - 60,9)	
Tasa de embarazo evolutivo (%)	43,8 (40,7 - 46,9)		58,9 (54,7 - 62,9)		43,2 (38,5 - 47,9)		56,3 (49,0 - 63,5)	
Tasa de recién nacido vivo (%)	37,8 (34,6 - 41,0)		53,4 (49,0 - 57,8)		35,9 (31,4 - 40,9)		52,0 (44,9 - 59,1)	

6. Tasa de implantación según cada categoría morfocinética

Se calculó la tasa de implantación según la distribución embrionaria en cada una de las categorías morfocinéticas propuestas por el modelo predictivo de selección (Meseguer *et al*, 2011), tanto en el grupo de ovocitos frescos como en el de vitrificados. No se observaron diferencias significativas para ninguna de las categorías en relación al origen de los ovocitos ($P>0,05$)(Figura 38).

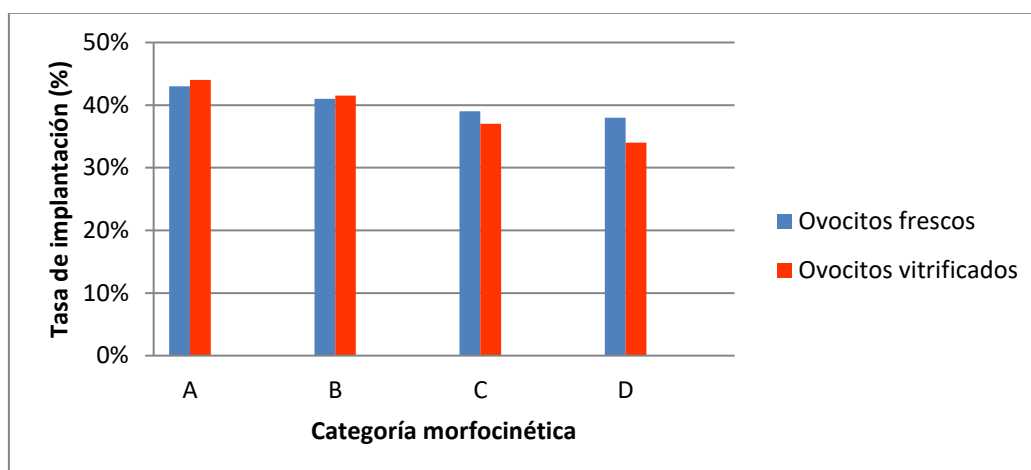


Figura 38. Tasa de implantación según cada categoría morfocinética.

RESULTADOS

Estudio II: Análisis de la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados

En total, se desvitrificaron 528 blastocistos de 386 ciclos, con una tasa de supervivencia del 97,2% (Figura 39). Todos los ciclos con embriones KID se seleccionaron para un análisis retrospectivo. Este análisis consideró 429 blastocistos desvitrificados: 180 de ciclos con implantación completa (el número de sacos gestacionales coincidía con el número de embriones transferidos) y 249 ciclos sin implantación (no se logró el embarazo bioquímico). La tasa global de implantación de los blastocistos KID fue del 42,0%.

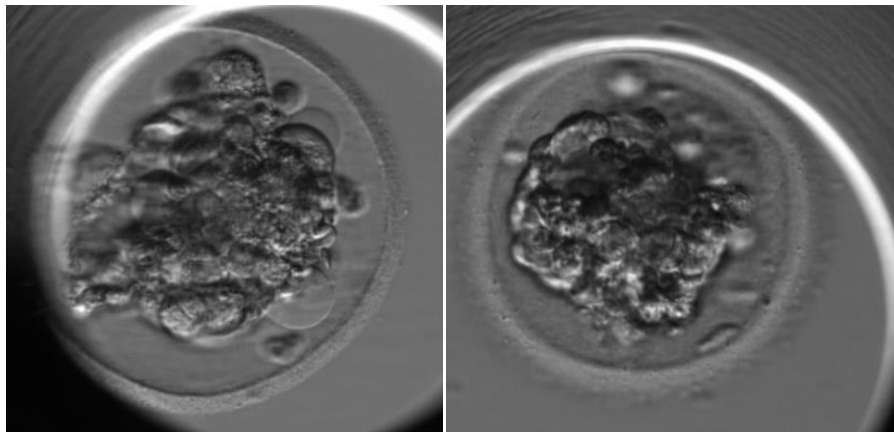


Figura 39. Blastocistos que no sobrevivieron al proceso de vitrificación.

1. Fase 1. Valores de los parámetros analizados y su relación con la tasa de implantación evolutiva.

La población de blastocistos mostró una distribución normal para todos los parámetros morfológicos y morfocinéticos analizados (Figura 40).

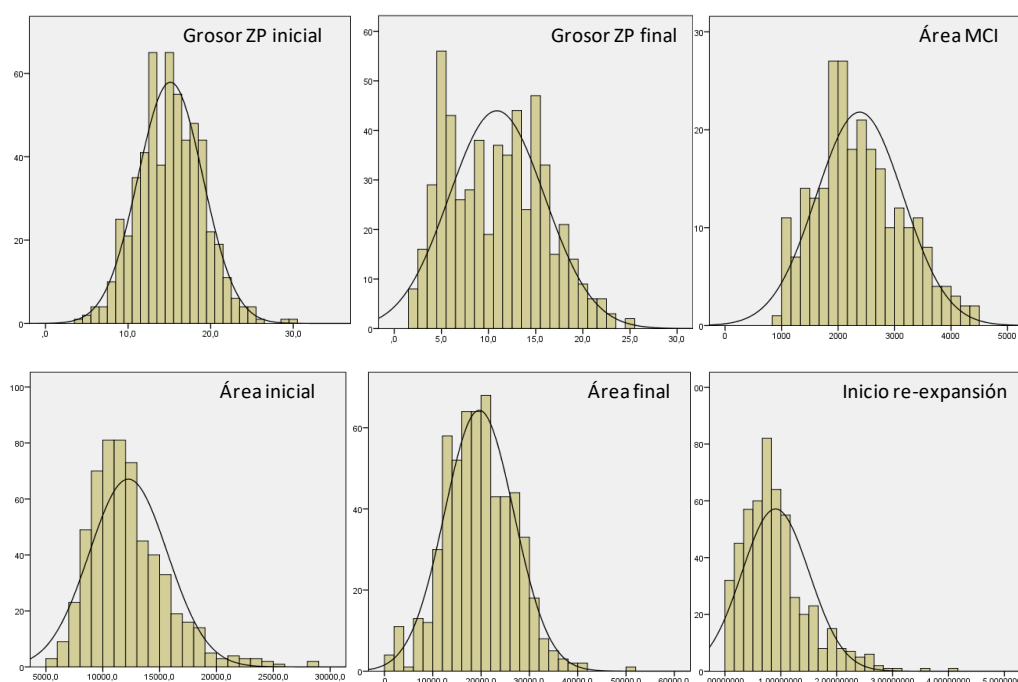


Figura 40. Distribución de los embriones según cada uno de los parámetros analizados.

La Tabla 7 muestra los valores medios de los parámetros analizados en el grupo de embriones que implantan y en los que no lo consiguen. Los valores medios no difirieron significativamente entre ambos grupos para ningún parámetro, excepto para el grosor de la ZP final, que tuvo un valor de 9,5 μm para los embriones que implantan y 11,3 μm para los que no ($P < 0,01$); y para el área de blastocistos final, cuyo valor es de 21236,9 μm^2 para los embriones que implantan y 19401,5 μm^2 para los que no implantan ($P < 0,01$). Los blastocistos que conseguían implantar, iniciaban antes la re-expansión que los que no implantaban, sin embargo, las diferencias no fueron significativas. La Figura 41 muestra el proceso de re-expansión a diferentes tiempos.

Tabla 7. Valores medios de los parámetros analizados para los embriones que implantan y los que no implantan.

	Blastocistos Implantados (N=133)	Blastocistos no implantados (N=296)	P valor
Grosor ZP inicial (μm)	14,5 \pm 3,9	15,3 \pm 3,9	0,06
Área inicial (μm^2)	12665,6 \pm 3605,7	12275,6 \pm 3395,6	0,28
Grosor ZP final (μm)	9,5 \pm 4,4	11,3 \pm 4,9	<0,01
Área final (μm^2)	21236,9 \pm 6409,8	19401,5 \pm 6783,7	<0,01
Área MCI (μm^2)	2340,5 \pm 774,7	2395,9 \pm 752,8	0,62
Inicio re-expansión (h)	0,84 \pm 0,53	0,92 \pm 0,62	0,22

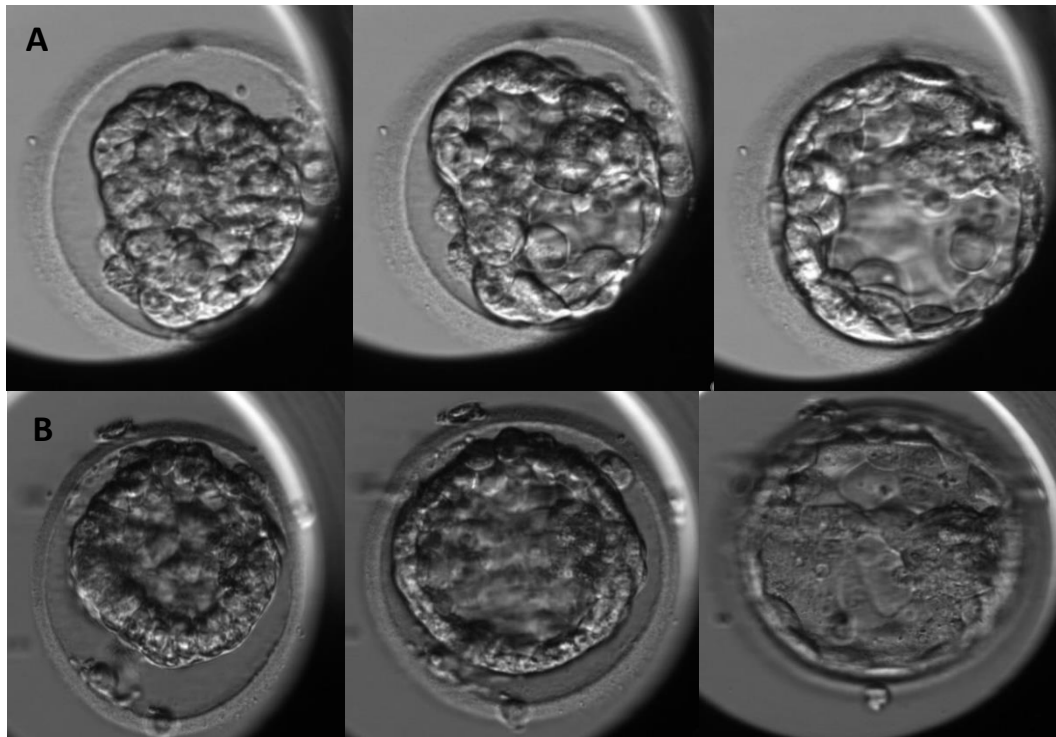


Figura 41. Proceso de re-expansión. A) Embrión 1 a las 0,6 h, 1,8 y 3,8 h;
B) Embrión 2 a las 0,4 h, 1,6 h y 4,1 h.

Posteriormente, las medidas de cada uno de los parámetros analizados se ordenaron en cuatro cuartiles (Q1, Q2, Q3 y Q4), con el objetivo de establecer la tasa de implantación en cada uno de ellos (Tabla 8). De este modo, se encontraron diferencias significativas entre los cuatro cuartiles al comparar el grosor de la ZP final ($P = 0,04$) y el área máxima ($P = 0,02$). Las categorías definidas por estos cuartiles se utilizaron para establecer los mejores rangos, en función de los cuartiles consecutivos con las mayores probabilidades de implantación.

Tabla 8. Valores exactos de los parámetros analizados según los cuartiles (Q1, Q2, Q3 y Q4) y la tasa de implantación (TI) de los blastocistos KID.

	Q1		Q2		Q3		Q4		P valor
	Limite	TI	Limite	TI	Limite	TI	Limite	TI	
Grosor ZP inicial (µm)	≤12	47,8	13-15	41,7	16-18	44,1	≥19	30,9	0,11
Área inicial (µm ²)	≤ 9900	33,3	9901-11681	47,8	11682-14026	45,2	≥14027	39,6	0,14
Grosor ZP final (µm)	≤ 6	49,6	7-11	44	12-15	39,6	≥16	29,1	0,04
Área final (µm ²)	≤ 14597	29,3	14598-19135	40,3	19136-24496	46,8	≥24497	48,6	0,02
Área MCI (µm ²)	≤ 1876	38,3	1877-2269	50	2270-2935	40,4	≥2940	42,9	0,68
Inicio re-expansión (h)	≤ 0,480	48,2	0,481 - 0,810	37,4	0,811 - 1,146	45,4	≥ 1,147	39,9	0,35

RESULTADOS

Después de establecer los rangos óptimos basados en los cuartiles consecutivos con más probabilidades de implantación, se encontraron diferencias significativas tanto en el grosor de la ZP como en el área del blastocisto después de la desvitrificación e inmediatamente antes de la transferencia. De esta forma, los blastocistos con una ZP mayor de 19 μm o área <9900 μm^2 tras la desvitrificación implantaban menos (Figuras 42 y 43).

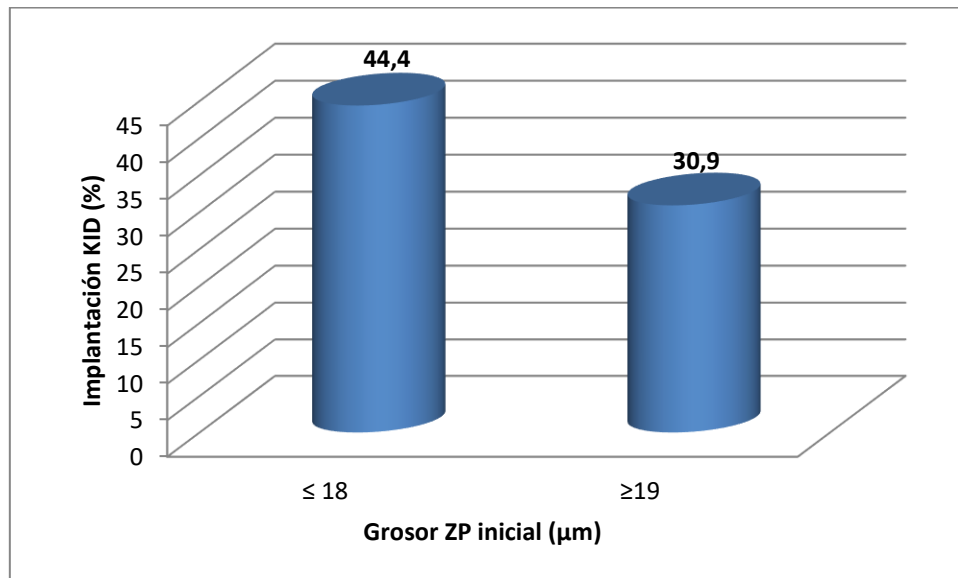


Figura 42. Tasa de implantación según el rango óptimo del grosor de la ZP inicial.

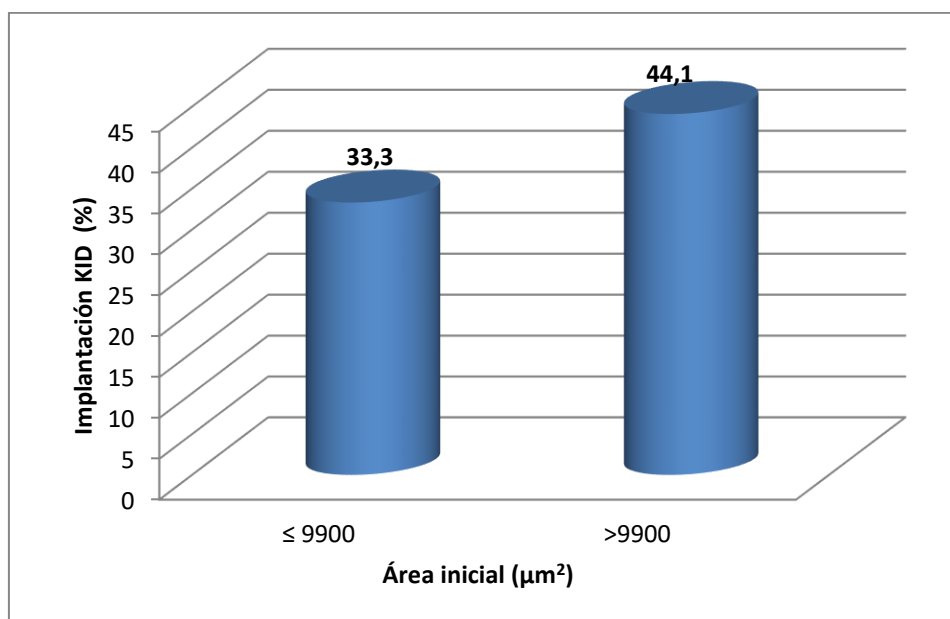


Figura 43. Tasa de implantación según el rango óptimo del grosor del área inicial.

Del mismo modo, cuando inmediatamente antes de la transferencia su ZP superaba las 11 μm y su área no era mayor de 14597 μm^2 , su tasa de implantación era significativamente más baja (Figuras 44 y 45).

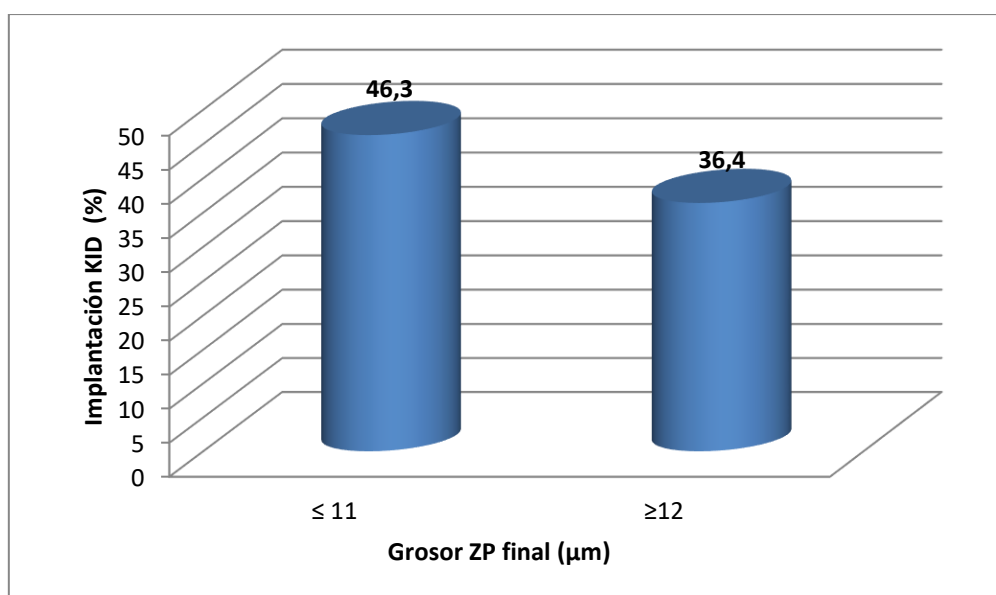


Figura 44. Tasa de implantación según el rango óptimo del grosor de la ZP final.

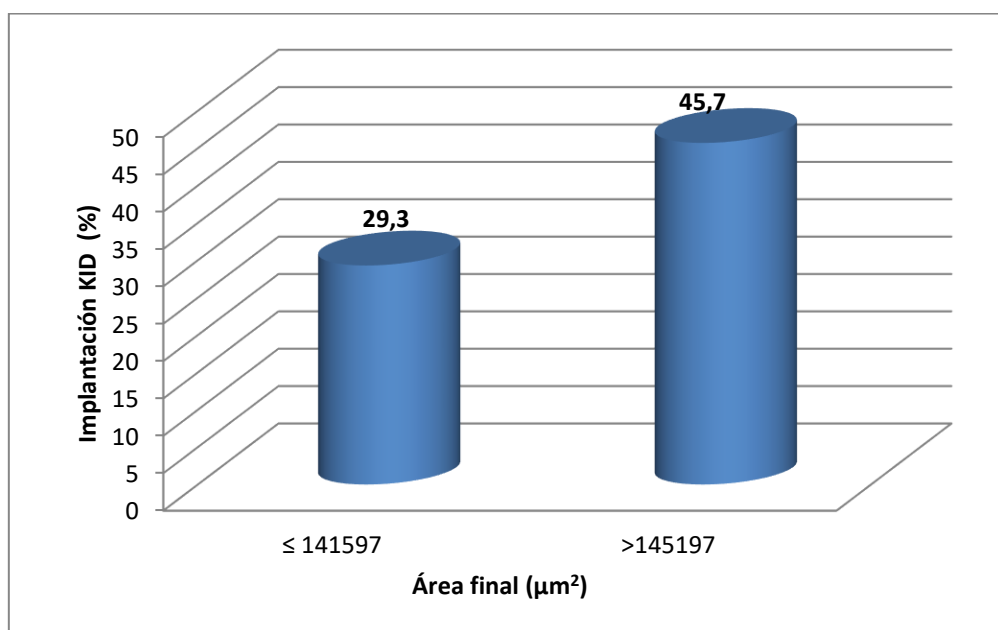


Figura 45. Tasa de implantación según el rango óptimo del grosor del área final.

Posteriormente, se analizó el grado de re-expansión utilizando el parámetro Af-Ai. Los blastocistos se distribuyeron en cuatro cuartiles según los valores que presentaban para este

RESULTADOS

parámetro: grupo 1, $<3463,0 \mu\text{m}^2$; grupo 2, $3463,0 - 6867,5 \mu\text{m}^2$; grupo 3, $6867,6 - 11112,5 \mu\text{m}^2$ y grupo 4, $11112,5 \mu\text{m}^2$. Los resultados se compararon entre los diferentes grupos, mostrando un evidente impacto en la tasa de implantación en los blastocistos con menor grado de re-expansión (Tabla 9).

Tabla 9. Regresión logística para el análisis de la implantación según el grado de expansión.

Categoría	OR	IC 95%	P valor
Grupo 2 vs. 1	1.03	0.55-1.94	NS
Grupo 3 vs. 1	1.72	0.94-3.15	NS
Grupo 4 vs. 1	1.94	1.06-3.56	0.03

1.1. Evaluación de la re-expansión embrionaria

Ya que el momento en el que el blastocisto iniciaba la expansión no parecía tener repercusión en la tasa de implantación, decidimos evaluar los resultados de aquellos blastocistos que no iniciaban el proceso de re-expansión después de la desvitrificación. De los 429 blastocistos desvitrificados, 30 (7%) no iniciaron la re-expansión tras el cultivo post-desvitrificación (Figura 46). Este grupo presentó una tasa de implantación significativamente menor (6,5%) comparado con los blastocistos que iniciaron la re-expansión (44,6%; $p < 0,0001$) (Figura 47).

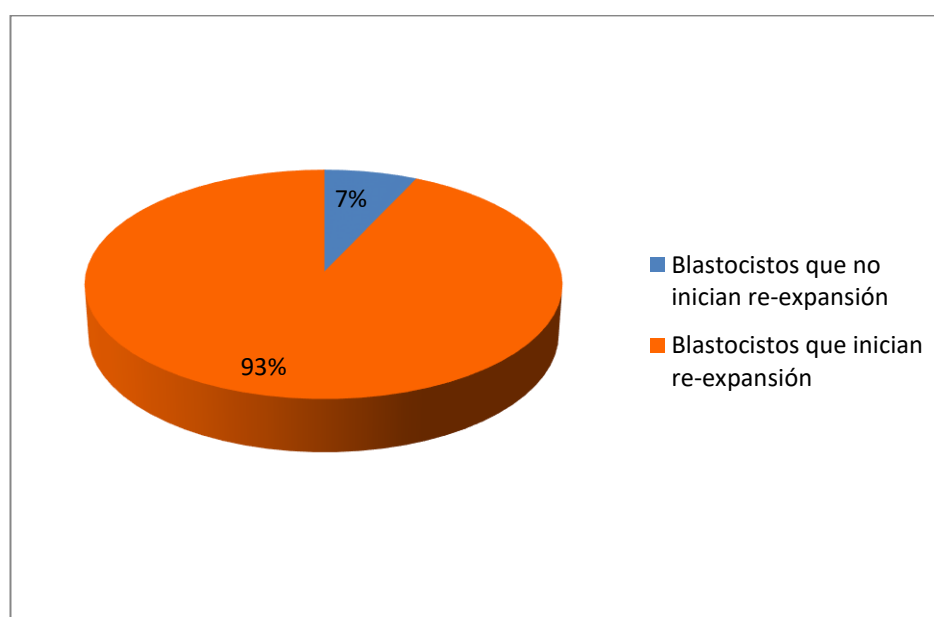


Figura 46. Distribución de los blastocistos según su capacidad de iniciar la re-expansión.

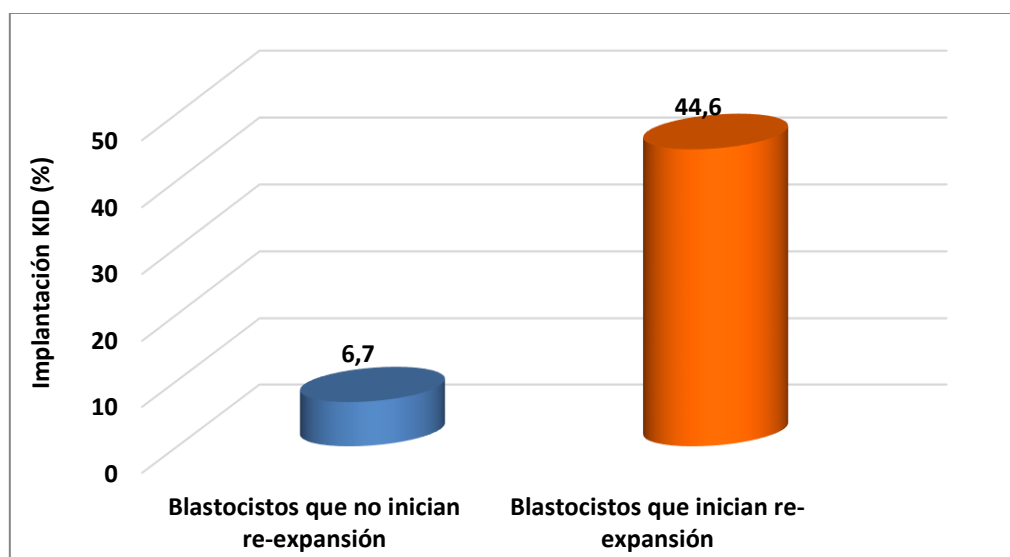


Figura 47. Tasa de implantación según su capacidad de iniciar la re-expansión.

Posteriormente, tratamos de evaluar si había alguna asociación entre las características de los blastocistos antes de la vitrificación y su capacidad para re-expandir tras la desvitrificación. Para ello, se relacionó la calidad morfológica y el grado de expansión de los blastocistos evaluados en su ciclo en fresco con la re-expansión post-desvitrificación. No se encontraron diferencias significativas para ninguna de estas variables entre los blastocistos que inician la re-expansión y aquellos que no lo hacen (Figuras 48 y 49). La Figura 50 muestra algunos blastocistos que no iniciaron la re-expansión durante el cultivo tras desvitrificación.

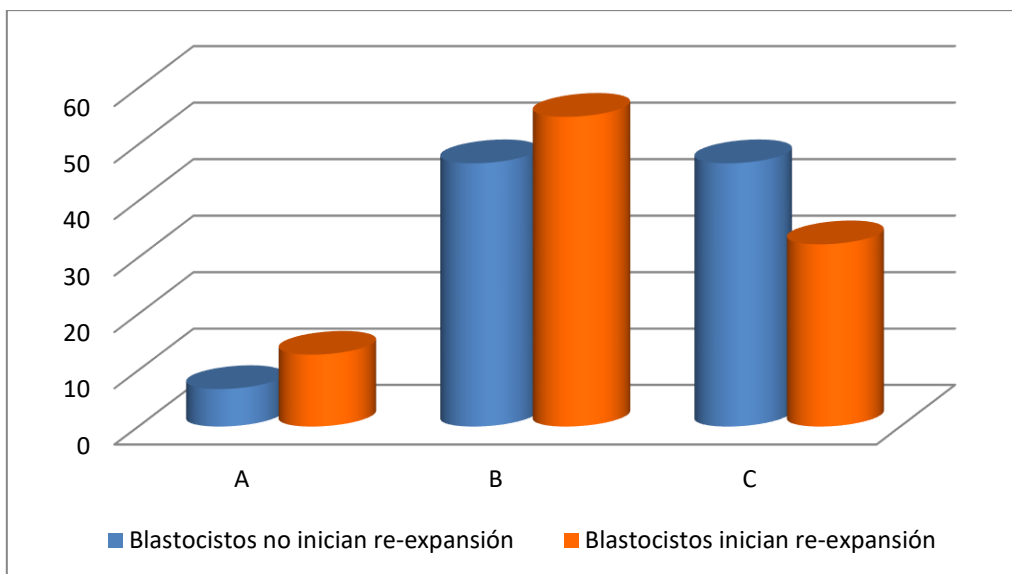


Figura 48. Distribución de embriones según calidad embrionaria pre-vitrificación (%).

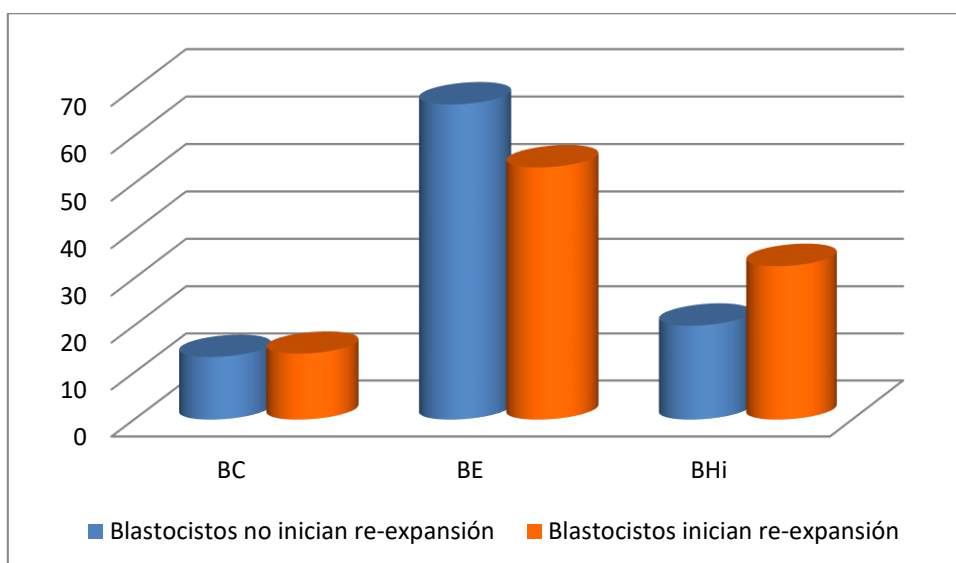


Figura 49. Distribución de embriones según grado de expansión pre-vitrificación (%).

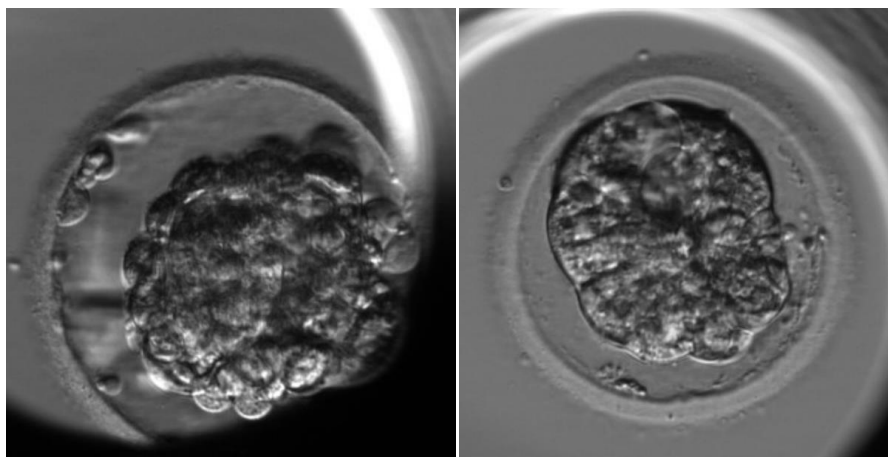


Figura 50. Blastocistos que no iniciaron re-expansión durante el cultivo.

1.2. Evaluación del colapso embrionario

Solo 47 de todos los blastocistos KID presentaron un colapso o más durante el cultivo embrionario tras la desvitrificación. No se observaron diferencias significativas en relación a la tasa de implantación entre estos blastocistos y los que no presentaron colapso alguno (42,8% vs. 40,9%; $p>0,1$) (Figura 51).

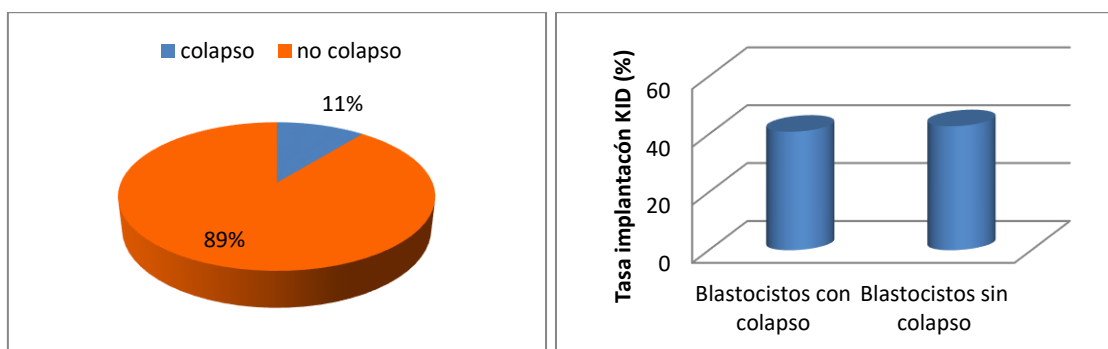


Figura 51. Estudio del colapso embrionario. a) Distribución de los blastocistos según la presencia de colapso embrionario; b) Tasa de implantación según la presencia de colapso embrionario.

1.3. Distribución embrionaria según la evaluación morfológica pre-vitrificación

El análisis de calidad morfológica pre-vitrificación mostró que los blastocistos clasificados morfológicamente como A presentaron una implantación similar a los clasificados como B, pero significativamente mejor a aquellos catalogados como C. Del mismo modo, los blastocitos con categorías de MCI y TE evaluadas como C presentaron una menor tasa de implantación en comparación con las catalogadas como A o B. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas respecto al grado de expansión del blastocite previtrificación (Tabla 10).

Tabla 10. Tasa de implantación según la clasificación morfológica pre-vitrificación.			
	N	TI (%)	IC 95%
GRADO DE EXPANSIÓN			
BC	60	43,3	30,8-55,8
BE	233	40,7	34,4-47,0
BHi	136	43,4	35,1-51,7
CLASIFICACIÓN ASEBIR			
A	50	46	32,2-59,8
B	204	48	41,1-54,9
C	174	33,9	26,9-40,9
CLASIFICACIÓN MCI			
A	109	52,3	42,9-61,7
B	260	40,8	34,8-46,8
C	60	28,3	16,9-39,7
CLASIFICACIÓN TE			
A	53	45,3	31,9-58,7
B	234	47,1	40,7-53,5
C	142	32,4	24,7-40,1

2. Fase 2: Generación del algoritmo de implantación

2.1. Distribución embrionaria en función de las categorías del modelo

Las correlaciones observadas entre los parámetros investigados y la tasa de implantación fueron la base de una propuesta jerárquica de clasificación. Para su realización, se utilizó un análisis por regresión logística con el fin de seleccionar y organizar qué parámetros observados (expresados como variables binarias; dentro o fuera del rango óptimo anteriormente definido) debían tenerse en cuenta para crear el modelo jerárquico. El análisis identificó el área final de los blastocistos, OR=0.41 (IC 95%: 0.22–0.77), seguida del área inicial, OR=0.62 (IC 95%: 0.35–1.08), como las variables más predictivas de implantación en los blastocistos desvitrificados analizados en este estudio. La calidad morfológica pre-vitrificación

El valor predictivo de los parámetros incluidos en el modelo en relación con la tasa de implantación presentó un valor ROC de 0.636. Si los valores del área final del blastocisto fueron $>14597 \mu\text{m}^2$, los blastocistos fueron categorizados como A o B, dependiendo de si los valores del área inicial fueron $>9900 \mu\text{m}^2$ o $\leq 9,900 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Del mismo modo, si los valores del área final fueron $\leq 14,597 \mu\text{m}^2$, los blastocitos se clasificaron como C o D, dependiendo de los valores del área inicial (Figura 52).

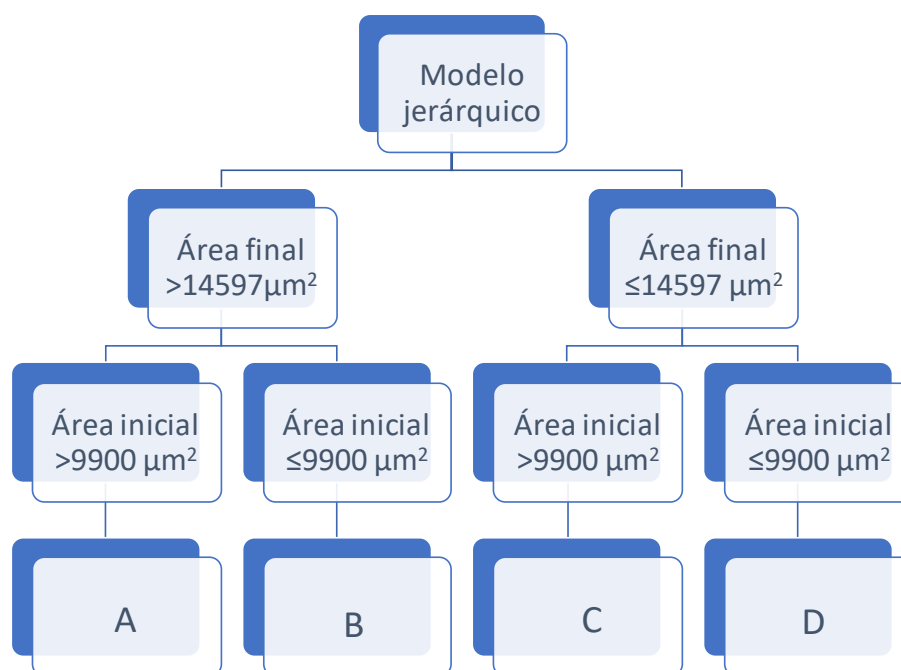


Figura 52. Distribución de embriones según calidad embrionaria pre-vitrificación (%).

Así, el procedimiento de clasificación jerárquica dividió los 429 blastocitos desvitrificados en cuatro categorías diferentes con potenciales decrecientes de implantación (desde 47.3% para la categoría A hasta 14.2% para la D; Tabla 11).

El análisis mediante la curva ROC presenta un valor de AUC de 0,66. Este tipo de análisis es una medida de la capacidad de clasificación del modelo donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminadora (Figura 53).

Tabla 11. Distribución de los blastocistos según el modelo de clasificación.

Categoría	Total	Blastocistos implantados	TI % (IC 95%)
A	266	126	47,3 (41,3-53,3)
B	64	28	43,7 (31,5-55,8)
C	64	21	32,8 (21,3-44,3)
D	35	5	14,2 (2,6-25,8)

TI: Tasa de implantación
IC: Intervalo de confianza

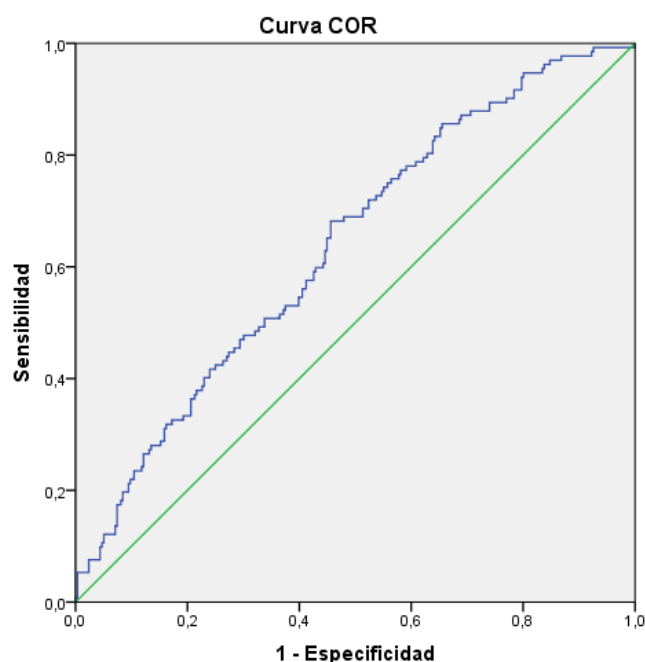


Figura 53. Curva ROC.

2.2. Análisis de factores de confusión

Se aplicó una nueva regresión logística a las categorías obtenidas teniendo en cuenta algunos posibles factores de confusión con algún efecto potencial sobre la tasa de implantación. Como factores de confusión, incluimos la edad de las donantes, la clasificación morfológica embrionaria según ASEBIR, el día en que los blastocistos se vitrificaron (día 5 y día 6), el IMC y el tiempo del cultivo (Tabla 12). De todas estas, se observó que el día en el que los blastocistos fueron vitrificados tuvo efecto sobre la tasa de implantación.

Tabla 12. Análisis por regresión logística teniendo en cuenta posibles factores de confusión.

Efecto del modelo	Valores	OR (IC95%)	P valor
Dinámica morfológica	A vs D	7,61 (1,76-32,97)	<0,01
	B vs D	6,72 (1,44-31,33)	0,01
ASEBIR Morfología del blastocisto	A vs C	1,81 (0,83-3,93)	ns
	B vs C	1,50 (0,93-2,41)	ns
Día de vitrificación	D5 vs. D6	1,68 (1,08-2,64)	0,02
Edad materna	Años	1,03 (0,95-1,11)	ns
Índice de masa corporal	Unidades	0,96 (0,88-1,04)	ns
Tiempo post- desvitrificación	Horas	1,11 (0,98-1,33)	ns

OR: Odd ratio

IC: Intervalo de confianza

ns: no significativo

3. Fase 3. Validación del modelo

3.1. Tasa de implantación evolutiva según cada categoría

Para la validación del modelo se incluyeron un total de 181 blastocistos KID, con una tasa de implantación de 39,2%. Después de realizar todas las medidas de los parámetros incluidos en el estudio, distribuimos los blastocistos según los valores que tenían para los parámetros más predictivos incluidos en el modelo original, dividiéndolos, por tanto, en cada una de las 4 categorías mencionadas anteriormente (Tabla 13).

Tabla 13. Distribución de los blastocistos según el modelo de clasificación.

Categoría	Total	Blastocistos implantados	TI % (IC 95%)
A	128	57	44,5 (35,8-53,3)
B	25	10	40,0 (19,4-60,6)
C	12	2	16,7 (-5,7-30,7)
D	16	2	12,5 (-8,1-41,4)

TI: Tasa de implantación
IC: Intervalo de confianza

Posteriormente, comparamos la distribución embrionaria en las diferentes categorías en el modelo original y en la validación, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,91 (Figura 54).

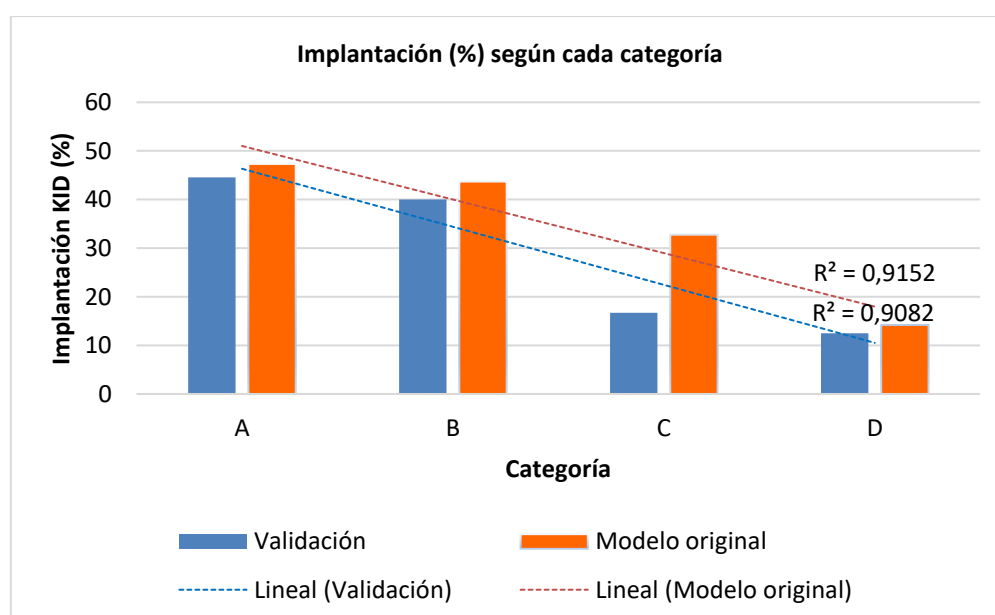


Figura 54. Comparación del modelo original con la validación.

V. DISCUSIÓN

El nacimiento de Louise Brown, el primer bebé “probeta” del mundo, marcó el inicio de la era de la RA. Cuarenta años después de ese acontecimiento, son más de 8 millones, los niños que han sido concebidos por un tratamiento de FIV. La clave de este éxito radica en la continua evolución que se ha producido en este campo, fruto de la investigación e innovación tecnológica. Durante este tiempo, hemos visto el advenimiento de nuevas técnicas y protocolos que han contribuido a incrementar las tasas de embarazo y de RNV sanos. Sin lugar a dudas, la incorporación de la vitrificación a la práctica clínica ha revolucionado el mundo de la RA.

Estudio I. Impacto de la vitrificación de ovocitos en la cinética embrionaria.

En los últimos años, la eficiencia, consistencia y reproducibilidad de la vitrificación de ovocitos ha quedado demostrada a través de numerosas publicaciones. La clave de su éxito radica en la capacidad de evitar la formación de hielo, pero también en su simplicidad, rapidez y bajo precio. A pesar de los riesgos de devitrificación durante el calentamiento o del potencial efecto tóxico de los ACPs, los increíbles resultados que ofrece, han alentado a numerosas clínicas a utilizarla como técnica de elección para la criopreservación del gameto femenino.

La vitrificación de ovocitos ha tenido un impacto positivo especialmente en los programas de donación de ovocitos al proporcionar resultados clínicos eficientes a la vez de facilitar su logística y funcionamiento. La validación clínica del uso de ovocitos vitrificados en los programas de ovodonación se demostró en un gran estudio clínico controlado y aleatorizado, donde se obtuvieron tasas de embarazo evolutivo comparables entre ovocitos frescos y vitrificados (Cobo *et al.*, 2010a). Posteriormente, el gran rendimiento de un banco de ovocitos fue confirmado en otro estudio donde se incluyeron más de 40000 ovocitos desvitrificados (Cobo *et al.*, 2015).

Las ventajas que aporta la vitrificación a la gestión de un banco de ovocitos, unidas a los buenos resultados obtenidos, ha incrementado su uso de forma gradual, convirtiéndose en una estrategia frecuente en los programas de ovodonación. Estos resultados positivos han permitido que la vitrificación de ovocitos se transmita a otras aplicaciones, principalmente a la PF (Cobo *et al.*, 2016).

Durante muchos años, resultó imposible alcanzar la meta de criopreservar el gameto femenino con éxito. Una de las razones que determinó estos malos resultados es su gran tamaño y su forma esférica, que inevitablemente condiciona sus características de permeabilidad. Además, su especial estructura está estrechamente vinculada a la susceptibilidad que sufre al enfriamiento. Los ovocitos maduros permanecen bloqueados en la

metafase de la segunda división meiótica. En esta etapa, la cromatina permanece condensada en forma de cromosomas que, a su vez, se conectan a los microtúbulos del huso. Este complejo aparato es un conglomerado dinámico de microtúbulos y proteínas estructurales asociadas, que actúan para coordinar la citocinética y los eventos cariocinéticos esenciales para conseguir una segregación cromosómica correcta (Jung and Cheon, 2014). Un huso meiótico es considerado normal cuando se observa una estructura en forma de barril donde los cromosomas se encuentran alineados en el plano ecuatorial del mismo.

Las divisiones meióticas se completan con la cooperación del citoesqueleto, convirtiéndose en un factor clave para obtener ovocitos competentes. Este se compone de tres estructuras filamentosas bien definidas, microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, que en conjunto constituyen una red interactiva. Este tipo de construcción se presta a un ensamble y un desensamble rápido, que depende de una regulación celular compleja. Mantener la estabilidad estructural tanto del huso como del citoesqueleto, resulta de extrema importancia para la competencia de los ovocitos. Desafortunadamente, muchas publicaciones han demostrado que la criopreservación ovocitaria puede causar una despolimerización del huso (Pickering and Johnson, 1987, Aman and Parks, 1994), así como efectos en la organización del citoesqueleto (Vincent *et al.*, 1989). La alteración de esta estructura conduce a una alineación incorrecta de los cromosomas que puede dar lugar a una segregación cromosómica alterada y, por tanto, una mayor incidencia de aneuploidías.

Con la introducción de la vitrificación, se ha solucionado en parte este problema. Las extremas velocidades de enfriamiento evitan el paso de los ovocitos por la franja de temperatura en la que se presentan la mayoría de los daños relacionados con la congelación lenta (daños por enfriamiento). Sin embargo, durante el proceso de equilibrado (primer paso de la vitrificación), los ovocitos, que aún retienen cierta actividad metabólica, pueden verse afectados adversamente por el repentino cambio de temperatura desde 37°C hasta temperatura ambiente (Liu *et al.*, 2017). Aunque los ACPs actúan como estabilizadores de la proteína tubulina, presente en el huso, la afección de esta estructura podría alterar el buen desarrollo de los eventos cinéticos posteriores a la fecundación, como la finalización de la meiosis, la extrusión del segundo CP, la migración de los pronúcleos, y la formación del primer huso mitótico.

La vitrificación de ovocitos también puede tener consecuencias a nivel molecular. Se ha descrito un descenso del 36,7% en el contenido de ARNm en ovocitos vitrificados en comparación con ovocitos frescos (Chamayou *et al.*, 2011). La disminución de estos ARNm es

particularmente relevante en el caso de las proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, la función energética y la organización estructural del ADN.

Además, durante la vitrificación, los ovocitos se someten a un alto estrés osmótico donde la mayoría del contenido de agua intracelular se reemplaza gradualmente con ACPs permeables (Vajta and Nagy, 2006). Estos agentes son capaces de alcanzar el estado vítreo cuando la temperatura desciende a una velocidad muy alta. Para ello, se deben usar a altas concentraciones, lo que conlleva una potencial citotoxicidad y un gran estrés osmótico. Durante el calentamiento, los ovocitos se rehidratan y los ACPs se diluyen, permitiendo que los ovocitos vuelvan a su conformación previa.

Aunque no se han observado diferencias en los resultados clínicos y en la morfología embrionaria en la mayoría de estudios que han comparado ovocitos frescos y vitrificados de donante (Cobo *et al.*, 2010a, Trokoudes *et al.*, 2011, Sole *et al.*, 2013), la afectación del huso meiótico, la expresión génica y los cambios drásticos en la composición del citosol que ocurren durante la vitrificación podrían causar alteraciones en los procesos de división celular, que serían fácilmente identificables a través de los patrones morfocinéticos de los embriones generados a partir de estos ovocitos. Por lo tanto, en este estudio, nuestro objetivo fue analizar la cinética de los embriones generados a partir de ovocitos vitrificados mediante la tecnología *time-lapse*, con el fin de dilucidar si la vitrificación puede causar efectos subcelulares capaces de alterar la dinámica de división celular normal. Para ello, se utilizó como grupo control, embriones generados a partir de ovocitos frescos que fueron cultivados en las mismas condiciones.

Tradicionalmente, el análisis del desarrollo de los embriones generados a partir de ovocitos desvitrificados se ha realizado a través de la evaluación morfológica, ya que era la única herramienta disponible hasta el momento. Aunque la morfología es un sistema de evaluación de la calidad embrionaria reconocido, últimamente la morfocinética ha demostrado ser una herramienta muy poderosa, ya que permite superar la subjetividad de los criterios actuales de selección embrionaria, a la vez que aporta una valoración cuantitativa de los aspectos clave del desarrollo de los embriones.

A través de esta tecnología, se toman imágenes del desarrollo embrionario en unos intervalos específicos. El ensamblaje de estas imágenes en una secuencia animada permite visualizar diferentes características de la dinámica celular, que de otro modo no hubieran podido ser observadas. El desarrollo embrionario es un proceso dinámico, con varias etapas críticas que pueden pasar desapercibidas con el uso de evaluaciones morfológicas

tradicionales. De esta forma, la incorporación de esta tecnología a la práctica habitual clínica supone una magnífica oportunidad de observar los cambios morfológicos que ocurren en los embriones, además de evaluar la importancia fisiológica de los mismos.

El análisis por *time-lapse* fue utilizado por primera vez para el estudio del desarrollo embrionario en el año 1929 (Lewis and Gregory, 1929), donde los autores analizaron el comportamiento de embriones de conejos cultivados hasta el estadio de blastocisto, pudiendo visualizar las contracciones y expansiones periódicas de los mismos. Lo más sorprendente de este trabajo fueron sus conclusiones, en las que, por aquél entonces, ya destacaron la gran ventaja de la cinematografía en el análisis del desarrollo embrionario, y su uso como una herramienta de trabajo en el laboratorio.

Este pionero estudio fue seguido por muchos otros aplicados al campo de la investigación, donde se evaluó el desarrollo embrionario en diferentes especies (Cole, 1967, Brackett *et al.*, 1972, Massip and Mulnard, 1980). Sin embargo, no fue hasta 1997 cuando se desarrolló la tecnología *time-lapse* para observar el proceso de fecundación en ovocitos humanos. Hasta la fecha, son numerosos los estudios publicados que han utilizado esta tecnología para el análisis embrionario. La mayoría de ellos se centran en mediciones de los eventos asociados al desarrollo temprano del embrión (Wong *et al.*, 2010, Azzarello *et al.*, 2012, Chamayou *et al.*, 2013, Aguilar *et al.*, 2014), mientras otros intentan predecir el potencial implantatorio (Meseguer *et al.*, 2011, Basile *et al.*, 2015,).

Además, se han analizado las variables morfocinéticas en relación a diferentes factores, tales como edad (Leibenthron *et al.*, 2012, Hampl and Stepan, 2013), ploidía (Chavez *et al.*, 2012b, Campbell *et al.*, 2013), reserva ovárica (Leibenthron *et al.*, 2012), indicación de infertilidad (Wissing and Mikkelsen, 2012), respuesta ovárica a la estimulación (Munoz *et al.*, 2012, Munoz *et al.*, 2013), mezcla de gases durante el cultivo embrionario (Meseguer *et al.*, 2012), medio de cultivo (Ciray *et al.*, 2012, Basile *et al.*, 2013), biopsia embrionaria (Terada *et al.*, 2009, Kroener *et al.*, 2012), método de fecundación (Cruz *et al.*, 2013), criopreservación de semen (Garcia *et al.*, 2012), índice de masa corporal de la mujer (Bellver *et al.*, 2013) o hábitos de tabaco en la mujer (Freour *et al.*, 2013).

Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la morfocinética de los embriones generados a partir de ovocitos vitrificados. El único artículo publicado al respecto hasta el momento se llevó a cabo con ovocitos hermanos de pacientes infértiles, de edades comprendidas entre los 29 y 39 años, limitando el análisis morfocinético a las 44 horas e incluyendo un total de 168 cigotos provenientes de ovocitos desvitrificados (Chamayou *et al.*, 2015).

Existen muchos factores que de alguna forma están implicados en el desarrollo embrionario y, por lo tanto, deben tenerse en cuenta para analizar los patrones morfocinéticos del embrión. Para minimizar dichos factores, diseñamos un estudio en el que (i) la fuente de ovocitos eran donantes incluidas en el programa de ovodonación del IVI, lo que redujo la variabilidad en la calidad del ovocito debido a la infertilidad femenina, (ii) las condiciones de cultivo fueron idénticas entre los ovocitos vitrificados y los frescos, lo que limitó el efecto de las variaciones de temperatura, humedad y concentración de gases, y (iii) se excluyeron muestras seminales de baja calidad, reduciendo el efecto del factor masculino. Además, en un análisis adicional se comparó la concentración y la movilidad espermática, obteniendo valores similares entre el grupo de ovocitos frescos y vitrificados. También se tuvieron en cuenta otros aspectos que podían tener un impacto en los resultados clínicos de los ciclos de donación, como la edad de las receptoras, su IMC o los días de preparación endometrial, no encontrándose diferencias entre ambos grupos.

La tasa de supervivencia obtenida, 94,5%, fue similar a la reportada por otros estudios utilizando el método Cryotop® en ciclos de ovodonación (Nagy *et al.*, 2009, Cobo *et al.*, 2010a, Trokoudes *et al.*, 2011), lo que muestra la consistencia de esta tecnología. Actualmente, para la vitrificación de ovocitos se pueden emplear diferentes dispositivos, cada uno con unas características específicas que influyen en el volumen de la solución a vitrificar, en las tasas de enfriamiento y calentamiento, y en los riesgos de contaminación. El sistema de vitrificación utilizado en el presente estudio fue diseñado por Kuwayama (Kuwayama *et al.*, 2005b) y permite cargar las muestras en volúmenes muy pequeños de solución. Una vez que los ovocitos se cargan en el Cryotop®, casi toda la solución se elimina por aspiración antes de la inmersión directa en NL. De esta forma, el volumen final de la solución a vitrificar es de alrededor de 0,1 µL. Usando este dispositivo como método de mínimo volumen, se pueden lograr velocidades de enfriamiento de hasta 23000°C/min, lo que permite disminuir la concentración de ACPs. Además, este dispositivo ofrece una velocidad de calentamiento de 42000°C/min, evitando así la recristalización o devitrificación.

Después de la desvitrificación, los ovocitos se mantuvieron 2 horas en cultivo antes de la microinyección. Este periodo se considera necesario para permitir que se restaure el citoesqueleto ovocitario y, en particular, el huso meiótico (Rienzi *et al.*, 2004). El número de MII microinyectados fue similar entre ambos grupos y las tasas de fecundación obtenidas resultaron comparables a las publicadas en trabajos previos (Cobo *et al.*, 2010a).

En el presente estudio, encontramos diferencias en la cinética de los embriones que se originaron a partir de ovocitos vitrificados. Estas diferencias fueron estadísticamente

significativas, y revelaron un retraso de aproximadamente 1 hora en cada división celular hasta la etapa de blastocisto temprano en el grupo de ovocitos vitrificados. Sin embargo, un hallazgo interesante fue el valor del parámetro cc2, que resultó ser exactamente el mismo entre los dos grupos. La correlación de este parámetro, definido como la duración del segundo ciclo celular, y la viabilidad embrionaria o implantación, se ha abordado en diferentes estudios. Wong observó que el valor de cc2 era predictivo de los embriones que alcanzaban el estado de blastocisto (Wong *et al.*, 2010), hecho que fue corroborado posteriormente en otros estudios (Cruz *et al.*, 2012, Dal Canto *et al.*, 2012). Meseguer reveló que este parámetro era uno de los más predictivos de implantación (Meseguer *et al.*, 2011), con unos valores significativamente distintos entre los embriones que implantaban y los que no. Además, en otro estudio se observó que los embriones con un valor de cc2 extremadamente corto (< 5h) presentaban una tasa de implantación muy baja (1,2%) (Rubio *et al.*, 2012).

La duración del cc2 también se ha correlacionado con los patrones de expresión génica. Un estudio concluyó que los embriones con valores de este parámetro fuera de un rango óptimo, presentaban patrones anormales de ARN para la citocinesis, biogénesis de micro ARN y reservas de ARNm materno, sugiriendo que el destino del embrión podía ser predeterminado y heredado muy tempranamente en el desarrollo (Wong *et al.*, 2010).

Con los resultados obtenidos en el presente estudio ha quedado demostrado que la duración del segundo ciclo celular no se altera en los embriones que provienen de ovocitos vitrificados respecto a los valores de los embriones que provienen de ovocitos frescos. Este es un hecho relevante porque la replicación del ADN ocurre durante este período. Por lo tanto, nos aventuramos a afirmar que los embriones en el grupo de ovocitos vitrificados en realidad no son más lentos que los del grupo de ovocitos frescos, sino que comienzan las divisiones celulares más tarde y, lo que es más importante, toman el mismo tiempo para la replicación del ADN. Esto podría explicar por qué estudios previos han mostrado tasas de implantación y resultados clínicos similares en ovocitos vitrificados *versus* frescos (Cobo *et al.*, 2010a, Doyle *et al.*, 2016).

Según la literatura, las alteraciones en el ritmo de división celular se basan principalmente en alteraciones cromosómicas que pueden retrasar las replications del ADN (Bean *et al.*, 2002, Lechniak *et al.*, 2008). El impacto del contenido cromosómico en el desarrollo embrionario ha sido estudiado con anterioridad desde un punto de vista estático (Munné *et al.*, 1995, Magli *et al.*, 2007, Alfarawati *et al.*, 2011). Posteriormente, diferentes estudios han intentado de relacionar los patrones morfocinéticos con la constitución cromosómica del embrión. Campbell trató de identificar embriones con aneuploidías mediante

el uso del sistema *time-lapse* (Campbell *et al.*, 2013), y observó que los embriones aneuploides presentaban valores comparables de los parámetros desde t2 hasta t8, pero alcanzaban la etapa de blastocisto completo más tarde en comparación con los embriones euploides. Sin embargo, en el presente estudio, los embriones que provienen de ovocitos vitrificados presentan un retraso en los parámetros desde t2 hasta t8, que desaparece cuando se alcanza el estadio de blastocisto expandido.

En un estudio reciente, también se observó que las duraciones medias para el CC2 y CC3 diferían significativamente entre los embriones normales y anormales (Chawla *et al.*, 2015). Como se ha mencionado anteriormente, en este estudio la duración de cc2 no se ve afectada en los embriones que provienen de ovocitos vitrificados. Además, algunas evidencias indican que la vitrificación de ovocitos no aumenta las tasas de aneuploidía en los embriones generados a partir de estos (Forman *et al.*, 2012), presentando una proporción similar de alteraciones cromosómicas que los embriones procedentes de ovocitos frescos (Gook and Edgar, 2007). Por lo tanto, intentamos buscar otras causas que explicaran el retraso obtenido en los embriones provenientes de ovocitos vitrificados.

Las alteraciones en el metabolismo de los embriones debido a condiciones de cultivo subóptimas también pueden causar cambios significativos en sus patrones de división, así como en los perfiles de expresión de los genes importantes para el desarrollo de las respuestas hipóxicas (Mullen *et al.*, 2004). Sin embargo, el retraso observado en las divisiones celulares en el grupo de ovocitos vitrificados no parece obedecer a esta causa, ya que las condiciones de cultivo estuvieron estrictamente controladas en el sistema *time-lapse* y fueron exactamente las mismas para los embriones procedentes de ovocitos frescos y vitrificados.

Otra evidencia adicional que puede respaldar la idea de que el metabolismo embrionario no se altera después de la vitrificación de ovocitos es el estudio de los perfiles metabólicos obtenidos del medio de cultivo donde se desarrollan los embriones. Los metabolitos de bajo peso molecular representan los productos finales del metabolismo celular y, por lo tanto, revelan la respuesta que los sistemas biológicos tienen a una variedad de condiciones genéticas, nutricionales y ambientales (Singh and Sinclair, 2007). En un estudio donde se analizó el medio de cultivo en el que se habían desarrollado los embriones, se concluyó que la vitrificación de ovocitos no perturbaba los perfiles metabólicos embrionarios (Dominguez *et al.*, 2013), lo que se refleja en los resultados clínicos.

De esta forma, pensamos que la causa que podía explicar los diferentes parámetros morfocinéticos en las primeras divisiones celulares después de la vitrificación podía ser mucho

más simple. Después de detener todos los procesos celulares y las reacciones metabólicas, la reactivación de toda la maquinaria puede llevarle más tiempo a los ovocitos desvitrificados, hecho que se vería reflejado en un retraso en las primeras divisiones. Además, esto puede implicar esfuerzos adicionales para las células, lo que podría suponer un mayor costo energético.

Las mitocondrias son esenciales para producir la energía requerida para realizar todos los procesos celulares coordinados, como la muerte celular programada o la formación de huso (Dumollard *et al.*, 2007). De hecho, la disfunción mitocondrial en ovocitos se ha correlacionado con la detención de embriones *in vitro* (Thouas *et al.*, 2004). El metabolismo mitocondrial y las vías de señalización intracelular pueden verse afectadas por los efectos osmóticos ocasionados durante la vitrificación. Además, se han observado alteraciones en la polaridad mitocondrial después de la congelación lenta de ovocitos, y este hecho se ha asociado con defectos en la señalización del Ca después de la inseminación (Jones *et al.*, 2004).

Aunque se observan cambios en la polaridad mitocondrial (Chen *et al.*, 2012) y alteraciones en el nivel de ATP (Manipalviratn *et al.*, 2011) después de la vitrificación de ovocitos, parecen ser temporales y están seguidos por una recuperación espontánea hasta los niveles observados en ovocitos frescos después de 3-4 horas de cultivo. Además, un estudio muy reciente ha demostrado que la vitrificación altera la función mitocondrial a través de la fosforilación oxidativa, causando un desplazamiento del equilibrio redox hacia el estado oxidado, aunque en este caso no observaron afección en la distribución y polaridad mitocondrial (Nohales-Corcoles *et al.*, 2016).

Es importante mencionar que la mayoría de estos estudios se realizaron con el uso de ovocitos inmaduros o madurados *in vitro*, por lo que es difícil extrapolar los resultados en ovocitos MII. Aun así, sería interesante evaluar si las alteraciones en el equilibrio redox tienen alguna relación con el retraso en los tiempos de división celular observado en nuestro estudio. Nosotros podríamos especular que la disminución de la actividad mitocondrial después de la vitrificación de ovocitos podría ser responsable del retraso en los tiempos de división celular. Así, la reversibilidad de las alteraciones observadas anteriormente (Manipalviratn *et al.*, 2011), respalda la teoría de que los ovocitos vitrificados necesitan más tiempo para superar los cambios que se producen. Sin embargo, el proceso se desarrolla normalmente una vez que la maquinaria responsable de la división celular se pone en funcionamiento, como muestran las duraciones similares del parámetro cc2 y las tasas de implantación.

La distribución de los embriones en todas las categorías morfocinéticas del árbol jerárquico fue similar entre ambos grupos, no observándose diferencias significativas para ninguna de ellas. Además, el potencial de implantación en cada categoría no difirió entre los embriones provenientes de ovocitos vitrificados y frescos. Esto indica que, a pesar del retraso en el inicio de las divisiones celulares, los embriones desarrollados a partir de ovocitos vitrificados tienen el mismo potencial de implantación, además de mostrar tasas clínicas y de embarazo similares, como ya se reportó en estudios previos.

Cabe destacar la menor proporción de embriones que cayó dentro de los rangos óptimos de división celular (t5, s2, cc2) en el grupo de vitrificación. No obstante, estas diferencias no se reflejaron cuando los embriones se clasificaron de acuerdo con el modelo de árbol jerárquico y, por lo tanto, no encontramos una explicación a este resultado.

El hecho de trabajar con ciclos que proceden únicamente del programa de donación de ovocitos permite descartar la posible influencia de la calidad ovocitaria, pero nos limita el hecho de poder extender estos resultados a otros grupos de pacientes. Por lo tanto, sería necesario confirmar estos resultados con pacientes infértiles y evaluar si las peores tasas obtenidas en estos ovocitos podrían deberse a una alteración subcelular que se viera reflejada a través de un patrón morfocinético alterado.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio representan una evidencia más de la eficiencia de la vitrificación aplicada a ovocitos de donante. Aunque el desarrollo embrionario presente un ligero retraso, la etapa de replicación del ADN permanece estable, y los resultados clínicos se muestran comparables a los obtenidos con ovocitos frescos.

Estudio II. Análisis de la dinámica de re-expansión de blastocistos desvitrificados.

La criopreservación de embriones se ha convertido en una estrategia terapéutica esencial en los laboratorios de FIV. Por un lado, permite lograr varios embarazos a partir de un solo ciclo de EOC, lo que contribuye a un incremento en las tasas acumuladas y, por tanto, a rentabilizar el tratamiento. Por otro lado, permite criopreservar con éxito los embriones sobrantes tras la transferencia en fresco, facilitando la política de transferencia de un solo embrión, y minimizando la incidencia de embarazos múltiples.

La transferencia del embrión desde el laboratorio al útero de la paciente es uno de los pasos más importantes en un tratamiento de RA. Tradicionalmente, los embriones se solían transferir en día 2 ó 3 de desarrollo, pero desde hace algunos años la transferencia en estadio de blastocisto ha ganado popularidad entre los expertos en la materia. Entre las razones que

avalarían esta nueva estrategia destaca el hecho de que los embriones con más potencial de implantación tienen más posibilidades de desarrollarse hasta blastocisto. Se ha descrito que solo entre el 40% y 60% de los ovocitos fecundados evolucionan hasta este estadio (Gardner *et al.*, 1998), mientras que el resto se bloquearía durante su desarrollo. De este modo, el retraso de la transferencia permitiría que la cohorte embrionaria se auto-seleccionara, siendo los embriones que llegan hasta blastocisto los que tendrían un mejor pronóstico. Por otro lado, se considera que realizar la transferencia en estadio de blastocisto es el momento más adecuado desde el punto de vista fisiológico, puesto que mejora la sincronía entre el endometrio y el desarrollo embrionario, al imitar el proceso de implantación natural (Milki *et al.*, 2000).

Estas observaciones se han demostrado clínicamente, ya que se han reportado mayores tasas de embarazo por embrión transferido en estadio de blastocisto que las observadas en estadio temprano (Glujovsky *et al.*, 2012, Wang and Sun, 2014), lo que ha impulsado el cambio hacia esta nueva estrategia. A la vez que el cultivo prolongado ha ido ganando terreno, la vitrificación en estadio de blastocisto se ha visto enormemente incrementada. Este aumento significativo en los ciclos de transferencia de blastocistos vitrificados fomenta el desarrollo de criterios de selección más precisos para evaluarlos.

Tradicionalmente, las evaluaciones de blastocistos frescos se han basado en la apariencia morfológica y en la evaluación de tres parámetros: el grado de expansión del blastocelo, el TE y la MCI (Gardner *et al.*, 1998, Gardner and Schoolcraft, 1999). Sin embargo, tras los procedimientos de vitrificación y desvitrificación, los blastocistos experimentan múltiples cambios morfológicos que pueden dificultar la evaluación de su calidad. Primero, se deshidratan mediante la adición de ACPs durante el enfriamiento y luego se re-hidratan mediante la dilución de estos durante el calentamiento. Tal encogimiento y expansión del blastocelo podría llevar al daño celular, y afectar, por tanto, su supervivencia o integridad morfológica. Además, los blastocistos a menudo se colapsan tras la desvitrificación, dificultando su evaluación. Es por ello que el cultivo post-desvitrificación brinda la oportunidad de evaluar los blastocistos con mayor precisión. Algunos autores recomiendan evaluar la supervivencia y la calidad entre 2 y 4 h después de desvitrificarlos (Kosasa *et al.*, 2005, Shu *et al.*, 2009). De hecho, la capacidad de re-expansión en este periodo ha sido reportada como un fuerte indicador del potencial de blastocisto (Desai and Goldfarb, 2005, Ebner *et al.*, 2009). Sin embargo, algunos blastocistos tardan más en re-expandir, y una sola observación no sería suficiente para evaluar su calidad. Además, el incremento en el tamaño del blastocelo es a veces difícil de evaluar porque depende del tiempo y puede cambiar durante el cultivo a

consecuencia de los colapsos. En tales casos, las evaluaciones de los blastocistos deben posponerse.

Es un hecho conocido que cada observación embrionaria implica la exposición a condiciones subóptimas fuera del entorno controlado del incubador, lo que puede afectar el éxito del tratamiento (Motato *et al.*, 2016). Por lo tanto, el monitoreo continuo de los blastocistos desvitrificados a través de un sistema *time-lapse* puede proporcionarnos información valiosa sobre su potencial de implantación, mientras estos permanecen dentro de un ambiente de cultivo estable y controlado.

En los últimos años, la evaluación de embriones mediante un sistema *time-lapse* ha proporcionado una comprensión más precisa del desarrollo de los embriones. Se han identificado diferentes parámetros morfocinéticos como marcadores de la viabilidad del embrión (Lemmen *et al.*, 2008, Wong *et al.*, 2010, Azzarello *et al.*, 2012) y se han propuesto modelos complementarios de selección de embriones (Meseguer *et al.*, 2011, Basile *et al.*, 2015). Sin embargo, la aplicación de esta tecnología en blastocistos desvitrificados apenas ha sido estudiada.

El EmbryoScope® ofrece la oportunidad de tomar medidas de diferentes estructuras embrionarias a través de herramientas de dibujo proporcionadas por el EmbryoViewer. Con este instrumento, los parámetros involucrados en la dinámica morfológica de los blastocistos desvitrificados se pueden evaluar durante el cultivo.

El objetivo principal de este estudio fue describir las variables implicadas en la dinámica morfológica de los blastocistos desvitrificados durante el período de tiempo entre la desvitrificación y la transferencia embrionaria, en un intento por comprender mejor el procedimiento de re-expansión. Posteriormente, consideramos relevante evaluar la correlación entre estas variables y el potencial reproductivo del embrión, definiendo el rango de valores asociados con mayores tasas de implantación. Es importante subrayar que este estudio proporciona valores cuantitativos objetivos para las variables implicadas en la re-expansión de los blastocistos, a diferencia de la evaluación morfológica subjetiva que se ha utilizado hasta la fecha. También realizamos un análisis multivariable para encontrar qué marcadores tenían más poder predictivo de implantación embrionaria. Como resultado, desarrollamos un modelo jerárquico para clasificar los blastocistos desvitrificados según su probabilidad de implantación.

La población de blastocistos en nuestro estudio mostró una distribución normal para todas las variables analizadas, pero con algunas peculiaridades. La distribución de los

embriones según el grosor de la ZP indicó que estos presentaban diferentes grados de re-expansión inmediatamente después de la desvitrificación. La dispersión de los datos fue mucho mayor cuando se analizó esta variable justo antes de la transferencia. Este resultado fue del todo esperable, y pone de manifiesto las diferencias en la dinámica de re-expansión entre los blastocistos desvitrificados durante el cultivo. De manera similar, la distribución del área inicial de los blastocistos reveló una población marginal de embriones con un tamaño mucho más grande que el promedio, lo que indica que muy probablemente estos blastocistos estaban ya re-expandidos después de la desvitrificación. Este hecho se confirmó al analizar los tiempos de inicio de re-expansión, puesto que la variabilidad encontrada en cuanto a esta variable incluía embriones re-expandidos al inicio del cultivo.

A partir de las medidas de las variables iniciales (grosor de la ZP y área de blastocisto inmediatamente después de la desvitrificación) obtuvimos información importante. Aunque se producen grandes variaciones en el grosor de la ZP entre embriones con un área similar, estas variables a menudo están relacionadas. Como muestran las Figuras 42 y 43, los blastocistos con un grosor de ZP > 18 μm y un área de $\leq 9900 \mu\text{m}^2$ inmediatamente después de la desvitrificación tienen menos probabilidades de implantar. Aunque estas medidas fueron tomadas una vez los blastocistos se desvitrificaron, podrían indicar que algunos de los embriones no estaban completamente expandidos en el momento de la vitrificación. Este hallazgo podría tener un valor práctico en el laboratorio, ya que tendría sentido vitrificar solo los blastocistos que se encuentran dentro del rango óptimo para estos parámetros.

La heterogeneidad en la distribución del área de los blastocistos antes de la transferencia mostró una población limitada de embriones con valores de área muy inferiores al resto, que representaría a los blastocistos sin re-expansión. Estos embriones solo se transfirieron si se confirmó la supervivencia a través de la evaluación morfológica.

Tradicionalmente, la evaluación morfológica de la re-expansión ha sido el principal método utilizado para las evaluaciones de blastocistos después de la vitrificación/desvitrificación (Cohen *et al.*, 1985, Veeck *et al.*, 2004). Al igual que los datos obtenidos en el presente estudio, otros han observado que este evento puede ocurrir poco después del calentamiento (Kosasa *et al.*, 2005), y se ha demostrado que tiene propiedades predictivas de implantación (Desai and Goldfarb, 2005). Shu y colaboradores (Shu *et al.*, 2009) investigaron el rol que la rápida re-expansión tenía en la selección de blastocistos desvitrificados para transferencia. Estos investigadores observaron que los blastocistos con re-expansión rápida (dentro de 2 a 4 h) implantaban a una mayor tasa en comparación con los blastocistos lentos o no re-expandidos. En el presente estudio, cuando analizamos el tiRE, no

encontramos diferencias entre los blastocistos que comenzaron la re-expansión inmediatamente y los que la comenzaron en las 2 h posteriores a la desvitrificación. Este resultado revela que los diferentes patrones temporales de re-expansión en los blastocistos que la inician no se correlacionan con la implantación. Sin embargo, el análisis de los blastocistos que no muestran re-expansión alguna reflejó una tasa de implantación 6 veces menor en este grupo.

El proceso de expansión en los blastocistos es un indicador de viabilidad embrionaria que viene precedido por la formación del blastocele. Para que esta cavidad se forme, el embrión debe desarrollar varias estructuras: (i) una capa celular externa polarizada, (ii) un mecanismo para la generación y transporte de agua necesaria para formar el fluido blastocólico, y (iii) un medio para controlar la fuga de este fluido fuera de la cavidad del blastocele (Biggers *et al.*, 1988).

La polarización de las células comienza durante el proceso de compactación, por la aparición de uniones estrechas focales que separan la membrana plasmática en dominios apicales y basolaterales (Smith and McLaren, 1977, Fleming *et al.*, 1989). Las células del TE adquieren las características de células epiteliales y comienzan a aplanarse y juntarse unas con otras a través de uniones estrechas (Ducibella and Anderson, 1975). El mecanismo de producción y acumulación del fluido blastocólico se basa en gran medida en las propiedades de transporte de iones de estas células (Biggers *et al.*, 1988). Sus membranas celulares contienen una bomba de sodio potasio (ATPasa Na^+/K^+) que transporta iones de Na^+ dentro de la cavidad central. Esta acumulación de Na^+ provoca el paso osmótico de agua, que se acumula en la cavidad blastocólica aumentando el volumen. La presencia de uniones estrechas es también necesaria, ya que proporciona una pared impermeable que permite la acumulación de fluido, regulando el transporte a través de las células, y contribuyendo a la polarización en la distribución de la ATPasa de Na^+/K^+ (Watson *et al.*, 1990).

Un estudio realizado con blastocistos de porcino demostró que los espacios intercelulares entre las células del TE se ensanchaban tras la desvitrificación, lo que conducía al colapso del blastocele (Fabian *et al.*, 2005). Sin embargo, después de un periodo de cultivo, los contactos intercelulares entre estas células se restauraban totalmente, permitiendo su formación de nuevo. Por lo tanto, es plausible pensar que la re-expansión del blastocele solo se produce si las células del TE se vuelven a sellar adquiriendo su configuración característica. En consecuencia, los embriones que no son capaces de recuperar este sellado después de la vitrificación/desvitrificación, se verían incapacitados para re-expandir.

Al igual que los resultados de este estudio, otros también han identificado la falta de re-expansión como un predictor fuertemente negativo de la implantación, llegándose a utilizar como marcador único de viabilidad (Desai and Goldfarb, 2005). Sin embargo, en nuestro estudio, los blastocistos que no iniciaron la re-expansión representaron solo el 7% de todos los blastocistos analizados, lo que indica que la implantación de la gran mayoría de los blastocistos desvitrificados no podría predecirse únicamente a partir de esta variable.

La búsqueda de nuevos factores que pronostiquen la implantación en ciclos de blastocistos desvitrificados ha atraído una considerable atención por parte de diferentes investigadores. Ahlström y colaboradores (Ahlstrom *et al.*, 2013) estudiaron cómo los parámetros morfológicos pre-vitrificación y post-desvitrificación podrían usarse para predecir los resultados de RNV. Su análisis reveló que el grado de expansión del blastocelo y la calidad del TE eran los factores predictivos pre-vitrificación más significativos, mientras que el grado de re-expansión fue el parámetro más predictivo después de la desvitrificación. Del mismo modo, Du evaluó los efectos del grado de expansión del blastocelo y la calidad de la MCI y TE en la predicción de RNV después de la transferencia de blastocistos frescos y desvitrificados (Du *et al.*, 2016). Este grupo concluyó que en ciclos de vitrificación el grado de re-expansión del blastocelo era mejor predictor de RNV que la calidad de la MCI o el TE. Muy recientemente, Desai y colaboradores (Desai *et al.*, 2016) también identificaron las características predictivas de embarazo y RNV en blastocistos desvitrificados. Estos autores también confirmaron que el grado de re-expansión antes de la transferencia era el factor predictivo más importante del éxito del tratamiento.

Nuestros hallazgos también confirmaron el valor predictivo de esta variable. Sin embargo, todos los estudios anteriores lo analizaron mediante una evaluación morfológica, lo que introduce un elemento clave de subjetividad. En un intento por superar esta desventaja, utilizamos un nuevo método para evaluar cuantitativamente el grado de re-expansión. Este trabajo presenta un enfoque objetivo ya que analiza, por primera vez, el grado de re-expansión en blastocistos desvitrificados mediante la definición de valores cuantitativos para diferentes variables, como el área del blastocisto, el grosor de su ZP o el del área diferencial (Af-Ai).

Después de un análisis multivariable, encontramos que las áreas inicial y final de los blastocistos fueron los indicadores más predictivos de implantación. En consecuencia, utilizamos ambos parámetros para generar nuestro modelo predictivo.

Como reflejó la regresión logística, los parámetros implicados en la dinámica morfológica se mantuvieron independientes de la morfología del blastocisto pre-vitrificación, y

esta última no se consideró relevante en nuestro modelo combinado a pesar de que los embriones clasificados en las categorías morfológicas A y B presentaron tasas de implantación más altas que los clasificados como C. Estas observaciones no indican que la evaluación morfológica tradicional no resulta útil, simplemente reconocen las variables de la dinámica morfológica como unas características independientes, que pueden combinarse con la morfología para obtener más información acerca del potencial de implantación del blastocisto.

Otro hallazgo importante fue que el número y la presencia de colapsos (12% de los blastocistos desvitrificados) no mostraron correlación con la implantación. Recientemente, un estudio demostró la relación entre el colapso del blastocisto y la disminución de la implantación en ciclos en fresco (Marcos *et al.*, 2015). Sin embargo, no pudimos confirmar esta correlación en ciclos con blastocistos desvitrificados. Los múltiples cambios morfológicos que experimentan los blastocistos durante la vitrificación pueden hacer que el patrón de colapsos cambie. Por lo tanto, el fenómeno observado en ciclos de vitrificación puede no ser el equivalente al observado en ciclos frescos.

Después de analizar los posibles factores de confusión, los resultados mostraron la importancia del día de vitrificación del blastocisto en la tasa de implantación. Este hallazgo concuerda con varios estudios que indican que el día de la formación del blastocisto es altamente predictivo de los resultados clínicos (Kang *et al.*, 2013, Desai *et al.*, 2016, Haas *et al.*, 2016). En nuestro estudio, todos los embriones se transfirieron en el 5º día de administración de progesterona y, por lo tanto, se descartó una posible asincronía uterina con mala receptividad endometrial. Como muestra la Tabla 10, la calidad de los embriones antes de la vitrificación fue similar en ambos grupos (día 5 vs. 6), por lo que los peores resultados obtenidos en los embriones que alcanzaron la etapa de blastocisto en día 6 podrían asociarse con mayores tasas de aneuploidías (Taylor *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que los blastocistos vitrificados en día 5 deben tener prioridad en un ciclo de desvitrificación.

El algoritmo elaborado en este estudio es el primer intento de predecir la implantación de blastocistos desvitrificados a partir de variables cuantitativas. Sin embargo, cabe destacar que no se trata de un algoritmo de selección embrionaria ya que, en la práctica clínica, se podría utilizar una vez se desvitrifica el blastocisto elegido para transferencia. Se trata más bien de un algoritmo de exclusión, ya que nos permitiría identificar blastocistos con pocas probabilidades de implantación. De esta forma, podría usarse para descartar la transferencia de un solo embrión y considerar la transferencia de dos embriones cuando el blastocisto no alcance los valores óptimos para los parámetros estudiados. Hoy en día, se recomienda la implementación de una política de transferencia embrionaria única en pacientes con buen

pronóstico para evitar los embarazos múltiples. Sin embargo, hay muy poca información disponible sobre los casos en los que esta estrategia sería apropiada cuando se utilizan blastocistos desvitrificados.

Es importante señalar las limitaciones que presenta este estudio. En primer lugar, el valor del AUC obtenida tras el análisis de la curva ROC fue relativamente bajo para un algoritmo discriminatorio, aunque la validación del mismo utilizando otro set de embriones presentó un valor alto de correlación. Sin embargo, sería apropiado realizar un estudio prospectivo para confirmar los resultados. Además, queda por ver si este modelo se puede aplicar a otros laboratorios en otras condiciones de cultivo o con diferentes metodologías de vitrificación, e incluso con otras poblaciones de pacientes.

En resumen, los datos presentados en este estudio mejoran nuestro conocimiento sobre la dinámica morfológica de los blastocistos tras la desvitrificación. El análisis retrospectivo de los datos indicó correlaciones entre los parámetros investigados y la implantación después de la transferencia embrionaria. El sistema de categorización presentado con el árbol jerárquico es un primer intento de construir un modelo predictivo para la implantación de blastocistos desvitrificados que han sido cultivados en el Embryoscope®. No obstante, las correlaciones observadas y el algoritmo propuesto deben validarse en un ensayo prospectivo para valorar su incorporación a la práctica clínica.

VI. CONCLUSIONES

1. Los ovocitos vitrificados de donante presentan un retraso en el desarrollo de aproximadamente 1 hora, en comparación con los ovocitos frescos. Este retraso se mantiene constante hasta el estadio de blastocisto.
2. La duración del segundo ciclo celular no se ve afectada por el proceso de vitrificación ovocitaria, indicando por tanto que no hay variación en la etapa de replicación del ADN.
3. La clasificación embrionaria según el modelo de árbol jerárquico, mostró que la proporción de embriones asignados a cada categoría morfocinética (A-E) era similar entre el grupo de ovocitos frescos y el de vitrificados.
4. La tasa de implantación según la distribución embrionaria en cada una de las categorías morfocinéticas propuestas por el algoritmo predictivo de selección fue similar entre el grupo de ovocitos frescos y el de vitrificados.
5. El retraso en el desarrollo observado en el grupo de ovocitos vitrificados podría deberse al tiempo extra necesario para reactivar toda la maquinaria celular tras la desvitrificación.
6. El análisis de la dinámica de re-expansión embrionaria mediante la tecnología *time-lapse* nos permite identificar variables asociadas a este proceso, así como dar rangos de valores cuantitativos objetivos relacionados con la implantación.
7. El sistema de categorización presentado con este árbol jerárquico es el primer intento de construir un modelo predictivo de implantación para blastocistos desvitrificados utilizando variables cuantitativas.
8. En la práctica clínica podría utilizarse para proporcionar a los pacientes más información sobre sus opciones reproductivas, así como para considerar la transferencia de dos embriones en los casos de blastocistos con las categorías más bajas.

La presente tesis doctoral ha dado lugar a dos publicaciones científicas en revistas internacionales del ámbito de la fertilidad y RA (Anexo 3).

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acton BM, Jurisicova A, Jurisica I, Casper RF. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Mol Hum Reprod* 2004;**10**:23-32.
- Agca Y, Liu J, Peter AT, Critser ES, Critser JK. Effect of developmental stage on bovine oocyte plasma membrane water and cryoprotectant permeability characteristics. *Mol Reprod Dev* 1998;**49**:408-415.
- Aguilar J, Motato Y, Escriba MJ, Ojeda M, Munoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online* 2014;**28**:475-484.
- Ahlstrom A, Westin C, Wikland M, Hardarson T. Prediction of live birth in frozen-thawed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze and post-thaw morphology. *Hum Reprod* 2013;**28**:1199-1209.
- Alberts B. Biología Molecular De La Célula, traducción al español de la 5ª edición. *Omega* Barcelona 2010.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011;**95**:520-524.
- Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000;**15**:2634-2643.
- Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL, Pereira PC. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Hum Reprod* 2010a;**25**:1192-1198.
- ALPHA Scientists In Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**:632-646.
- Alvarez M, Sole M, Devesa M, Fabregas R, Boada M, Tur R, *et al*. Live birth using vitrified--warmed oocytes in invasive ovarian cancer: case report and literature review. *Reprod Biomed Online* 2014;**28**:663-8.
- Aman RR, Parks JE. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes. *Biol Reprod* 1994;**50**:103-110.
- Antinori M, Licata E, Dani G, Cerusico F, Versaci C, Antinori S. Cryotop vitrification of human oocytes results in high survival rate and healthy deliveries
- Arav A, Gianaroli L, Bafaro G, Diotalevi L. A new vitrification technique for 8-cell stage mouse embryos. Presented at: IVF Meeting Barcelona, 1987. Abs 373, p. 118.
- Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology* 2014;**81**:96-102.
- Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2002;**187**:77-81.
- Asch RH, Li HP, Balmaceda JP, Weckstein LN, Stone SC. Severe ovarian hyperstimulation syndrome in assisted reproductive technology: definition of high risk groups. *Hum Reprod* 1991;**6**:1395-1399.

- Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L, Shen S. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril* 2014;**101**:1637-48.e1-5.
- Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod* 2012;**27**:2649-2657.
- Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, Gardner DK. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod* 2008;**23**:1976-1982.
- Bank H, Maurer RR. Survival of frozen rabbit embryos. *Exp Cell Res* 1974;**89**:188-196.
- Basile N, Morbeck D, Garcia-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013;**28**:634-641.
- Basile N, Nogales Mdel C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, Garcia-Velasco J, Meseguer M. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril* 2014;**101**:699-704.
- Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, Garcia Velasco JA, Remohi J, Meseguer M. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod* 2015;**30**:276-283.
- Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006;**86**:1608-1615.
- Bean CJ, Hassold TJ, Judis L, Hunt PA. Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system. *Human Reproduction* 2002;**17**:2362-2367.
- Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L, Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2013;**28**:794-800.
- Bianchi V, Coticchio G, Fava L, Flamigni C, Borini A. Meiotic spindle imaging in human oocytes frozen with a slow freezing procedure involving high sucrose concentration. *Hum Reprod* 2005;**20**:1078-1083.
- Biggers JD, Bell JE, Benos DJ. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. *Am J Physiol* 1988;**255**:C419-32.
- Bonetti A, Cervi M, Tomei F, Marchini M, Ortolani F, Manno M. Ultrastructural evaluation of human metaphase II oocytes after vitrification: closed versus open devices. *Fertil Steril* 2011;**95**:928-935.
- Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, Gorhony B, Kitiyanant Y, Dinnyes A. Gene expression profiles and in vitro development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 2006;**73**:700-708.
- Brackett BG, Mills JA, Jeitles GG. In vitro fertilization of rabbit ova recovered from ovarian follicles. *Fertil Steril* 1972;**23**:898-909.
- Brevini TA, Vassena R, Francisci C, Gandolfi F. Role of adenosine triphosphate, active mitochondria, and microtubules in the acquisition of developmental competence of parthenogenetically activated pig oocytes. *Biol Reprod* 2005;**72**:1218-1223.

- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013;**26**:477-485.
- Camus A, Clairaz P, Ersham A, Van Kappel AL, Savic G, Staub C. The comparison of the process of five different vitrification devices. *Gynecol Obstet Fertil* 2006;**34**:737-745.
- Chamayou S, Romano S, Alecci C, Storaci G, Ragolia C, Palagiano A, Guglielmino A. Oocyte vitrification modifies nucleolar remodeling and zygote kinetics-a sibling study. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:581-586.
- Chamayou S, Bonaventura G, Alecci C, Tibullo D, Di Raimondo F, Guglielmino A, Barcellona ML. Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology* 2011;**62**:130-134.
- Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, Crescenzo C, Guglielmino A. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet* 2013;**30**:703-710.
- Chang LJ, Huang CC, Tsai YY, Hung CC, Fang MY, Lin YC, Su YN, Chen SU, Yang YS. Blastocyst biopsy and vitrification are effective for preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases. *Hum Reprod* 2013;**28**:1435-1444.
- Chavez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, Behr B, Pera RAR. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nature communications* 2012;**3**:1251.
- Chawla M, Fakih M, Shunnar A, Bayram A, Hellani A, Perumal V, Divakaran J, Budak E. Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. *J Assist Reprod Genet* 2015;**32**:69-75.
- Chen C, Han S, Liu W, Wang Y, Huang G. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:1045-1050.
- Chen C. Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet* 1986;**1**:884-886.
- Chen C, Han S, Liu W, Wang Y, Huang G. Effect of vitrification on mitochondrial membrane potential in human metaphase II oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:1045-1050.
- Chen CK, Wang CW, Tsai WJ, Hsieh LL, Wang HS, Soong YK. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy. *Fertil Steril* 2004;**82**:666-672.
- Chen SU, Chien CL, Wu MY, Chen TH, Lai SM, Lin CW, Yang YS. Novel direct cover vitrification for cryopreservation of ovarian tissues increases follicle viability and pregnancy capability in mice. *Hum Reprod* 2006;**21**:2794-2800.
- Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. *Hum Reprod* 2000;**15**:2598-2603.
- Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Hum Reprod* 2001;**16**:2350-2356.
- Chen SU, Yang YS. Slow freezing or vitrification of oocytes: their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2009;**48**:15-22.

BIBLIOGRAFÍA

Chang CC, Elliott TA, Wright G, Shapiro DB, Toledo AA, Nagy ZP. Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertil Steril* 2013;**99**:1891-7.

Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A, Venturoli S. Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertil Steril* 2009;**91**:2399-2407.

Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:891-900.

Ciray HN, Coban O, Bayram A, Kizilkanat A, Bahceci M. Preliminary study of embryo development following assessment of male and female gametes. *Reprod Biomed Online* 2008;**16**:875-880.

Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahceci M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril* 2006;**85**:358-365.

Cobo A, Castello D, Vallejo B, Albert C, de los Santos JM, Remohi J. Outcome of cryotransfer of embryos developed from vitrified oocytes: double vitrification has no impact on delivery rates. *Fertil Steril* 2013;**99**:1623-1630.

Cobo A, de los Santos MJ, Castello D, Gamiz P, Campos P, Remohi J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril* 2012;**98**:1138-46.e1.

Cobo A, Domingo J, Perez S, Crespo J, Remohi J, Pellicer A. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clin Transl Oncol* 2008a;**10**:268-273.

Cobo A, Garcia-Velasco JA, Coello A, Domingo J, Pellicer A, Remohi J. Oocyte vitrification as an efficient option for elective fertility preservation. *Fertil Steril* 2016;**105**:755-64.e8.

Cobo A, Garcia-Velasco JA, Domingo J, Remohi J, Pellicer A. Is vitrification of oocytes useful for fertility preservation for age-related fertility decline and in cancer patients? *Fertil Steril* 2013;**99**:1485-1495.

Cobo A, Garrido N, Crespo J, Jose R, Pellicer A. Accumulation of oocytes: a new strategy for managing low-responder patients. *Reprod Biomed Online* 2012;**24**:424-432.

Cobo A, Garrido N, Pellicer A, Remohi J. Six years' experience in ovum donation using vitrified oocytes: report of cumulative outcomes, impact of storage time, and development of a predictive model for oocyte survival rate. *Fertil Steril* 2015;**104**:1426-34.e1-8.

Cobo A, Kuwayama M, Perez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohi J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008b;**89**:1657-1664.

Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010a;**25**:2239-2246.

Cobo A, Romero JL, Perez S, de los Santos MJ, Meseguer M, Remohi J. Storage of human oocytes in the vapor phase of nitrogen. *Fertil Steril* 2010b;**94**:1903-1907.

- Cobo A, Serra V, Garrido N, Olmo I, Pellicer A, Remohi J. Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertil Steril* 2014;**102**:1006-1015.e4.
- Coello A, Campos P, Remohi J, Meseguer M, Cobo A. A combination of hydroxypropyl cellulose and trehalose as supplementation for vitrification of human oocytes: a retrospective cohort study. *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:413-421.
- Cohen J, Simons RF, Edwards RG, Fehilly CB, Fishel SB. Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985;**2**:59-64.
- Cole RJ. Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1967;**17**:481-490.
- Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, Baker VL, Adamson GD, Abusief ME, Gvakharina M. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril* 2013;**100**:412-419. e5.
- Coticchio G, Bonu MA, Bianchi V, Flamigni C, Borini A. Criteria to assess human oocyte quality after cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2005;**11**:421-427.
- Coticchio G, Bromfield JJ, Sciajno R, Gambardella A, Scaravelli G, Borini A, Albertini DF. Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online* 2009;**19 Suppl 3**:29-34.
- Crowe JH, Crowe LM, Mouradian R. Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology* 1983;**20**:346-356.
- Crowe LM, Mouradian R, Crowe JH, Jackson SA, Womersley C. Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochim Biophys Acta* 1984;**769**:141-150.
- Cruz M, Garrido N, Gadea B, Munoz M, Perez-Cano I, Meseguer M. Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model. *Reprod Biomed Online* 2013;**27**:367-375.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012;**25**:371-381.
- da Motta EL, Bonavita M, Alegretti JR, Chehin M, Serafini P. Live birth after 6 years of oocyte vitrification in a survivor with breast cancer. *J Assist Reprod Genet* 2014;**31**:1397-400.
- Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, Comi R, Fadini R. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012;**25**:474-480.
- De Munck N, Santos-Ribeiro S, Stoop D, Van de Velde H, Verheyen G. Open versus closed oocyte vitrification in an oocyte donation programme: a prospective randomized sibling oocyte study. *Hum Reprod* 2016;**31**:377-384.
- De Munck N, Vajta G. Safety and efficiency of oocyte vitrification. *Cryobiology* 2017;**78**:119-127.
- Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014;**12**:54.

BIBLIOGRAFÍA

- Desai N, Goldfarb J. Examination of frozen cycles with replacement of a single thawed blastocyst. *Reprod Biomed Online* 2005;**11**:349-354.
- Desai N, Ploskonka S, Goodman L, Attaran M, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. Delayed blastulation, multinucleation, and expansion grade are independently associated with live-birth rates in frozen blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 2016;**106**:1370-1378.
- Desai NN, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod Biol Endocrinol* 2013;**11**:41-7827-11-41.
- Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 2000;**63**:513-518.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod* 2000;**62**:564-570.
- Dominguez F, Castello D, Remohí J, Simón C, Cobo A. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. *Fertil Steril* 2013;**99**:565-572. e3.
- Dondorp WJ, De Wert GM. Fertility preservation for healthy women: ethical aspects. *Hum Reprod* 2009;**24**:1779-1785.
- Doyle JO, Richter KS, Lim J, Stillman RJ, Graham JR, Tucker MJ. Successful elective and medically indicated oocyte vitrification and warming for autologous in vitro fertilization, with predicted birth probabilities for fertility preservation according to number of cryopreserved oocytes and age at retrieval. *Fertil Steril* 2016;**105**:459-66.e2.
- Du QY, Wang EY, Huang Y, Guo XY, Xiong YJ, Yu YP, Yao GD, Shi SL, Sun YP. Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 2016;**105**:910-919.e1.
- Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 2000;**529 Pt 1**:57-68.
- Ducibella T, Anderson E. Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. *Dev Biol* 1975;**47**:45-58.
- Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007;**77**:21-49.
- Ebner T, Vanderzwalmen P, Shebl O, Urdl W, Moser M, Zech NH, Tews G. Morphology of vitrified/warmed day-5 embryos predicts rates of implantation, pregnancy and live birth. *Reprod Biomed Online* 2009;**19**:72-78.
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984;**1**:3-23.
- Emiliani S, Van den Bergh M, Vannin AS, Biramane J, Englert Y. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. *Hum Reprod* 2000;**15**:905-910.
- Eroglu A, Toth TL, Toner M. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril* 1998;**69**:944-957.

- Escrich L, Grau N, de los Santos MJ, Romero JL, Pellicer A, Escriba MJ. The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril* 2012;**98**:1147-1151.
- ESHRE Task Force on Ethics and Law, Dondorp W, de Wert G, Pennings G, Shenfield F, Devroey P, Tarlatzis B, Barri P, Diedrich K. Oocyte cryopreservation for age-related fertility loss. *Hum Reprod* 2012;**27**:1231-1237.
- Fabian D, Gjørret JO, Berthelot F, Martinat-Botté F, Maddox-Hyttel P. Ultrastructure and cell death of in vivo derived and vitrified porcine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 2005;**70**:155-165.
- Fahy GM, Wowk B, Wu J, Paynter S. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 2004;**48**:22-35.
- Fleming TP, McConnell J, Johnson MH, Stevenson BR. Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1. *J Cell Biol* 1989;**108**:1407-1418.
- Forman EJ, Li X, Ferry KM, Scott K, Treff NR, Scott RT, Jr. Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: a novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertil Steril* 2012;**98**:644-649.
- Freour T, Dessolle L, Lammers J, Lattes S, Barriere P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril* 2013;**99**:1944-1950.
- Gallardo M, Hebles M, Migueles B, Dorado M, Aguilera L, Gonzalez M, Piqueras P, Montero L, Sanchez-Martin P, Sanchez-Martin F *et al.* Thermal and clinical performance of a closed device designed for human oocyte vitrification based on the optimization of the warming rate. *Cryobiology* 2016;**73**:40-46.
- Gallicano GI, McGaughey RW, Capco DG. Cytoskeleton of the mouse egg and embryo: reorganization of planar elements. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991;**18**:143-154.
- Garcia JI, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. Efficacy of oocyte vitrification combined with blastocyst stage transfer in an egg donation program. *Hum Reprod* 2011;**26**:782-90.
- Garcia L, Martinez M, Navaro M, Cano I, Cantero M, Meseguer M. Does semen cryopreservation have influence on embryo kinetics? *Fertil Steril* 2012;**98**:S164.
- Garcia-Velasco JA, Domingo J, Cobo A, Martinez M, Carmona L, Pellicer A. Five years' experience using oocyte vitrification to preserve fertility for medical and nonmedical indications. *Fertil Steril* 2013;**99**:1994-1999.
- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998;**69**:84-88.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;**73**:1155-1158.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;**11**:307-311.

- Ghetler Y, Yavin S, Shalgi R, Arav A. The effect of chilling on membrane lipid phase transition in human oocytes and zygotes. *Hum Reprod* 2005;**20**:3385-3389.
- Glujovsky D, Blake D, Bardach A, Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane database of systematic reviews* 2012;.
- Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2016;**105**:275-85.e10.
- Gook DA, Edgar DH. Human oocyte cryopreservation. *Hum Reprod Update* 2007;**13**:591-605.
- Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2010;**93**:2602-2607.
- Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munne S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril* 2011;**95**:953-958.
- Haas J, Meriano J, Laskin C, Bentov Y, Barzilay E, Casper RF, Cadesky K. Clinical pregnancy rate following frozen embryo transfer is higher with blastocysts vitrified on day 5 than on day 6. *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:1553-1557.
- Hampl R, Stepan M. Variability in timing of human embryos cleavage monitored by time-lapse system in relation to patient age. *Ceska Gynekol* 2013;**78**:531-536.
- Hara H, Hwang IS, Kagawa N, Kuwayama M, Hirabayashi M, Hochi S. High incidence of multiple aster formation in vitrified-warmed bovine oocytes after in vitro fertilization. *Theriogenology* 2012;**77**:908-915.
- Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly (dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril* 2012;**97**:332-337.
- Hashimoto S, Amo A, Hama S, Ohsumi K, Nakaoka Y, Morimoto Y. A closed system supports the developmental competence of human embryos after vitrification : Closed vitrification of human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2013;**30**:371-376.
- Herrero J, Tejera A, Albert C, Vidal C, de los Santos MJ, Meseguer M. A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertil Steril* 2013;**100**:1602-9.e1-4.
- Herrero L, Pareja S, Aragonés M, Cobo A, Bronet F, Garcia-Velasco JA. Oocyte versus embryo vitrification for delayed embryo transfer: an observational study. *Reprod Biomed Online* 2014;**29**:567-572.
- Herrero L, Pareja S, Losada C, Cobo AC, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Avoiding the use of human chorionic gonadotropin combined with oocyte vitrification and GnRH agonist triggering versus coasting: a new strategy to avoid ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril* 2011;**95**:1137-1140.
- Johnson MH, Pickering SJ. The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte. *Development* 1987;**100**:313-324.
- Johnson MH, Pickering SJ, George MA. The influence of cooling on the properties of the zona pellucida of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1988;**3**:383-387.

- Jones A, Van Blerkom J, Davis P, Toledo AA. Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence. *Human Reproduction* 2004;**19**:1861-1866.
- Jung YJ, Cheon YP. Improvement of the vitrification method suppressing the disturbance of meiotic spindle and chromosome systems in mature oocytes. *Dev Reprod* 2014;**18**:117-125.
- Kang SM, Lee SW, Yoon SH, Kim JC, Lim JH, Lee SG. Comparison of clinical outcomes between single and double vitrified-warmed blastocyst embryo transfer according to the day of vitrification. *J Assist Reprod Genet* 2013;**30**:779-785.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T. A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 1990;**89**:91-97.
- Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online* 2004;**9**:164-170.
- Kasai M, Nishimori M, Zhu SE, Sakurai T, Machida T. Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. *Biol Reprod* 1992;**47**:1134-1139.
- Kasai M, Zhu SE, Pedro PB, Nakamura K, Sakurai T, Edashige K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. *Cryobiology* 1996;**33**:459-464.
- Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014;**20**:617-631.
- Kim MK, Lee DR, Han JE, Kim YS, Lee WS, Won HJ, *et al*. Live birth with vitrified-warmed oocytes of a chronic myeloid leukemia patient nine years after allogeneic bone marrow transplantation. *J Assist Reprod Genet* 2011;**28**:1167-70.
- Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Human Reproduction* 2013;**28**:2643-2651.
- Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992;**149**:80-89.
- Kosasa TS, McNamee PI, Morton C, Huang TT. Pregnancy rates after transfer of cryopreserved blastocysts cultured in a sequential media. *Am J Obstet Gynecol* 2005;**192**:2035-9; discussion 2039-40.
- Kroener L, Ambartsumyan G, Briton-Jones C, Dumesic D, Surrey M, Munne S, Hill D. The effect of timing of embryonic progression on chromosomal abnormality. *Fertil Steril* 2012;**98**:876-880.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod* 1999;**14**:3077-3079.
- Kumasako Y, Otsu E, Utsunomiya T, Araki Y. The efficacy of the transfer of twice frozen-thawed embryos with the vitrification method. *Fertil Steril* 2009;**91**:383-386.

BIBLIOGRAFÍA

- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online* 2005a;**11**:608-614.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005b;**11**:300-308.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol* 1999;**17**:1234-1236.
- Larman MG, Sheehan CB, Gardner DK. Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes. *Reproduction* 2006;**131**:53-61.
- Lechniak D, Pers-Kamczyc E, Pawlak P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reproductive biology* 2008;**8**:23-42.
- Leibenthron J, Montag M, Koster M, Toth B, Reinsberg J, Van der Ven H. Influence of age and AMH on early embryo development realised by time-lapse imaging. *Hum Reprod* 2012;**27**(Suppl. 2): ii162-ii205.
- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:385-391.
- Lewis WH, Gregory P. Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science* 1929;**69**:226-229.
- Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod* 2002;**67**:1671-1680.
- Liebermann J, Tucker MJ. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 2002;**124**:483-489.
- Liebermann J, Tucker MJ, Graham JR, Han T, Davis A, Levy MJ. Blastocyst development after vitrification of multipronuclear zygotes using the Flexipet denuding pipette. *Reprod Biomed Online* 2002;**4**:146-150.
- Liu M, Zhou W, Chu D, Fu L, Sha W, Liu S, Li Y. A modified vitrification method reduces spindle and chromosome abnormalities. *Systems biology in reproductive medicine* 2017;**63**:199-205.
- Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. *Fertil Steril* 2016;**105**:656-662.e1.
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2008;**90**:186-193.
- LOVELOCK JE. Biophysical aspects of the freezing and thawing of living cells. *Proc R Soc Med* 1954;**47**:60-62.
- Luyet B HE. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air. *Exp Biol Med* 1938;**39**:433-34.
- Luyet BJ. Differential Staining for Living and Dead Cells. *Science* 1937;**85**:106.

- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 2007;**87**:534-541.
- Mamo S, Bodo S, Kobolak J, Polgar Z, Tolgyesi G, Dinnyes A. Gene expression profiles of vitrified in vivo derived 8-cell stage mouse embryos detected by high density oligonucleotide microarrays. *Mol Reprod Dev* 2006;**73**:1380-1392.
- Manipalviratn S, Tong Z, Stegmann B, Widra E, Carter J, DeCherney A. Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. *Fertil Steril* 2011;**95**:1839-1841.
- Mantikou E, Youssef MA, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, Mastenbroek S. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2013;**19**:210-220.
- Marcos J, Perez-Albala S, Mifsud A, Molla M, Landeras J, Meseguer M. Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2015;**30**:2501-2508.
- Martin J, Cervero A, Mir P, Martinez-Conejero JA, Pellicer A, Simon C. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril* 2013;**99**:1054-61.e3.
- Martinez M, Rabadan S, Domingo J, Cobo A, Pellicer A, Garcia-Velasco JA. Obstetric outcome after oocyte vitrification and warming for fertility preservation in women with cancer. *Reprod Biomed Online* 2014;**29**:722-8.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 1996;**54**:1059-1069.
- Massip A, Mulnard J. Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J Reprod Fertil* 1980;**58**:475-478.
- Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology* 2001;**42**:139-144.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984;**247**:C125-42.
- MAZUR P. Causes of Injury in Frozen and Thawed Cells. *Fed Proc* 1965;**24**:S175-82.
- Mazur P. The role of cell membranes in the freezing of yeast and other single cells. *Ann N Y Acad Sci* 1965;**125**:658-676.
- MAZUR P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol* 1963;**47**:347-369.
- Mazur P, Leibo SP, Chu EH. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp Cell Res* 1972;**71**:345-355.
- Meryman HT. Absence of unfrozen freezable water in rapidly frozen red cells. *Cryobiology* 1970;**7**:252-255.
- Meseguer M. Time-Lapse Microscopy in In-Vitro Fertilization. 1st edn, 2016. Cambridge University Press.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;**26**:2658-2671.

BIBLIOGRAFÍA

- Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012;**98**:1481-9.e10.
- Milki A, Hinckley M, Behr B. Three is a crowd with blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;**73**:S15.
- Miller DP, de Pablo JJ, Corti H. Thermophysical properties of trehalose and its concentrated aqueous solutions. *Pharm Res* 1997;**14**:578-590.
- Montag M, Liebenthron J, Koster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta* 2011;**32 Suppl 3**:S252-6.
- Moore NW, Bilton RJ. Frozen storage of embryos of farm animals: progress and implications. *Ciba Found Symp* 1977;**(52)**:203-219.
- Moore NW, Bilton RJ. The storage of fertilized sheep ova at 5 degrees C. *Aust J Biol Sci* 1973;**26**:1421-1427.
- Motato Y, de los Santos, María José, Escriba MJ, Ruiz BA, Remohí J, Meseguer M. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertil Steril* 2016;**105**:376-384. e9.
- Moussa M, Shu J, Zhang X, Zeng F. Cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: current problems and future perspectives. *Sci China Life Sci* 2014;**57**:903-914.
- Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* 1998;**13**:2874-2879.
- Mullen S, Agca Y, Broermann D, Jenkins C, Johnson C, Critser J. The effect of osmotic stress on the metaphase II spindle of human oocytes, and the relevance to cryopreservation. *Human reproduction* 2004;**19**:1148-1154.
- Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;**64**:382-391.
- Munoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I, Meseguer M. The type of GnRH analogue used during controlled ovarian stimulation influences early embryo developmental kinetics: a time-lapse study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013;**168**:167-172.
- Munoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I, Meseguer M. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online* 2012;**25**:382-389.
- Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, Shitara H, Yonekawa H, Hoshi K. Correlation of abnormal mitochondrial distribution in mouse oocytes with reduced developmental competence. *Tohoku J Exp Med* 2006;**210**:137-144.
- Nagy ZP, Chang CC, Shapiro DB, Bernal DP, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Toledo AA, Kort HI. Clinical evaluation of the efficiency of an oocyte donation program using egg cryo-banking. *Fertil Steril* 2009;**92**:520-526.
- Neuber E, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D. Sequential embryo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. *Fertil Steril* 2006;**85**:794-796.

- Nogales MDC, Bronet F, Basile N, Martínez EM, Liñán A, Rodrigo L, Meseguer M. Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics. *Fertil Steril* 2017;**107**:229-235. e2.
- Nohales-Corcoles M, Sevillano-Almerich G, Di Emidio G, Tatone C, Cobo AC, Dumollard R, De Los Santos Molina MJ. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Hum Reprod* 2016;**31**:1850-1858.
- Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2006;**86**:70-80.
- O'Neil L, Paynter SJ, Fuller BJ. Vitrification of mature mouse oocytes: improved results following addition of polyethylene glycol to a dimethyl sulfoxide solution. *Cryobiology* 1997;**34**:295-301.
- Paffoni A, Guarneri C, Ferrari S, Restelli L, Nicolosi AE, Scarduelli C, Ragni G. Effects of two vitrification protocols on the developmental potential of human mature oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;**22**:292-298.
- Papatheodorou A, Vanderzwalmen P, Panagiotidis Y, Prapas N, Zikopoulos K, Georgiou I, Prapas Y. Open versus closed oocyte vitrification system: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Reprod Biomed Online* 2013;**26**:595-602.
- Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril* 2010;**94**:1525-1528.
- Parmegiani L, Cognigni GE, Bernardi S, Cuomo S, Ciampaglia W, Infante FE, Tabarelli de Fatis C, Arnone A, Maccarini AM, Filicori M. Efficiency of aseptic open vitrification and hermetical cryostorage of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2011;**23**:505-512.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;**12**:532-541.
- Perrin J, Saias-Magnan J, Broussais F, Bouabdallah R, D'Ercole C, Courbiere B. First French live-birth after oocyte vitrification performed before chemotherapy for fertility preservation. *J Assist Reprod Genet* 2016;**33**:663-6.
- Petyim S, Makemahar O, Kunathikom S, Choavaratana R, Laokirkkiat P, Penparkkul K. The successful pregnancy and birth of a healthy baby after human blastocyst vitrification using Cryo-E, first case in Siriraj Hospital. *J Med Assoc Thai* 2009;**92**:1116-1121.
- Pickering SJ, Johnson MH. The influence of cooling on the organization of meiotic spindle of the mouse oocyte. *Human Reproduction* 1987;**2**:207-216.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH. Cryoprotection of human oocytes: inappropriate exposure to DMSO reduces fertilization rates. *Hum Reprod* 1991;**6**:142-143.
- Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte. *Fertil Steril* 1990;**54**:102-108.
- POLGE C, SMITH AU, PARKES AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949;**164**:666.

BIBLIOGRAFÍA

Potdar N, Gelbaya TA, Nardo LG. Oocyte vitrification in the 21st century and post-warming fertility outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2014;**29**:159-176.

Practice Committees of American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. *Fertil Steril* 2013;**99**:37-43.

Racca A, Santos-Ribeiro S, De Munck N, Mackens S, Drakopoulos P, Camus M, Verheyen G, Tournaye H, Blockeel C. Impact of late-follicular phase elevated serum progesterone on cumulative live birth rates: is there a deleterious effect on embryo quality? *Hum Reprod* 2018;**33**:860-868.

Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985;**313**:573-575.

Rall WF, Meyer TK. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology* 1989;**31**:683-692.

Ramsing N, Callesen H. P-153: Detecting timing and duration of cell divisions by automatic image analysis may improve selection of viable embryos. *Fertil Steril* 2006;**86**:S189.

Remohi J, Gallardo E, Guanes PP, Simon C, Pellicer A. Donor-recipient synchronization and the use of gonadotrophin-releasing hormone agonists to avoid the premature luteinizing hormone surge in oocyte donation. *Hum Reprod* 1995;**10 Suppl 2**:84-90.

Remohí J, Cobo A, Romero J, De los Santos MJ, Pellicer A. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Laboratorio de reproducción asistida. 3ª edición. McGraw Hill Interamerica 2008.

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S, Racowsky C. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update* 2017;**23**:139-155.

Rienzi L, Martinez F, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Tesarik J, Greco E. Polscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures. *Hum Reprod* 2004;**19**:655-659.

Rienzi L, Romano S, Albricci L, Maggiulli R, Capalbo A, Baroni E, Colamaria S, Sapienza F, Ubaldi F. Embryo development of fresh 'versus' vitrified metaphase II oocytes after ICSI: a prospective randomized sibling-oocyte study. *Hum Reprod* 2010;**25**:66-73.

Roque M, Valle M, Guimaraes F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril* 2015;**103**:1190-1193.

Rubio I, Galan A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, Meseguer M. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014;**102**:1287-1294.e5.

Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, Bellver J, Meseguer M. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012;**98**:1458-1463.

Rudolph AS, Crowe JH. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 1985;**22**:367-377.

- Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE, Parks JE. Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology* 1993;**30**:562-580.
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998;**13**:182-187.
- Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003;**18**:821-825.
- Sanchez-Serrano M, Crespo J, Mirabet V, Cobo AC, Escriba MJ, Simon C, Pellicer A. Twins born after transplantation of ovarian cortical tissue and oocyte vitrification. *Fertil Steril* 2010;**93**:268.e11-268.e13.
- Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 2011;**141**:1-19.
- Sathananthan AH. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 1997;**10**:21-38.
- Schatten G, Simerly C, Schatten H. Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;**82**:4152-4156.
- Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010;**94**:1700-1706.
- Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophectoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril* 2013;**100**:615-619.
- Seki S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 2009;**59**:75-82.
- Seki S, Mazur P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. *Biol Reprod* 2008;**79**:727-737.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 2011;**96**:344-348.
- SHERMAN JK, LIN TP. Temperature shock and cold-storage of unfertilized mouse eggs. *Fertil Steril* 1959;**10**:384-396.
- Shoukir Y, Chardonens D, Campana A, Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998;**13**:1632-1637.
- Shu Y, Watt J, Gebhardt J, Dasig J, Appling J, Behr B. The value of fast blastocoele re-expansion in the selection of a viable thawed blastocyst for transfer. *Fertil Steril* 2009;**91**:401-406.
- Siano L, Engmann L, Nulsen J, Benadiva C. A prospective pilot study comparing fertilization and embryo development between fresh and vitrified sibling oocytes. *Conn Med* 2013;**77**:211-7.

- Sills ES, Murray GU, Genton MG, Walsh DJ, Coull GD, Walsh AP. Clinical features and reproductive outcomes for embryos undergoing dual freeze-thaw sequences followed by blastocyst transfer: critique of 14 consecutive cases in IVF. *Fertil Steril* 2009;**91**:1568-1570.
- Singh R, Sinclair K. Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality. *Theriogenology* 2007;**68**:S56-S62.
- Smith GD, Serafini PC, Fioravanti J, Yadid I, Coslovsky M, Hassun P, Alegretti JR, Motta EL. Prospective randomized comparison of human oocyte cryopreservation with slow-rate freezing or vitrification. *Fertil Steril* 2010;**94**:2088-2095.
- Smith R, McLaren A. Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. *J Embryol Exp Morphol* 1977;**41**:79-92.
- Sole M, Santalo J, Boada M, Clua E, Rodriguez I, Martinez F, Coroleu B, Barri PN, Veiga A. How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013;**28**:2087-2092.
- Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnyes A, Nagai T, Kikuchi K. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology* 2007;**55**:115-126.
- Spinaci M, Vallorani C, Bucci D, Tamanini C, Porcu E, Galeati G. Vitrification of pig oocytes induces changes in histone H4 acetylation and histone H3 lysine 9 methylation (H3K9). *Vet Res Commun* 2012;**36**:165-171.
- Stachecki JJ, Cohen J. An overview of oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2004;**9**:152-163.
- Sugiyama R, Nakagawa K, Shirai A, Sugiyama R, Nishi Y, Kuribayashi Y, Inoue M. Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). *J Assist Reprod Genet* 2010;**27**:161-167.
- Sun X, Li Z, Yi Y, Chen J, Leno GH, Engelhardt JF. Efficient term development of vitrified ferret embryos using a novel pipette chamber technique. *Biol Reprod* 2008;**79**:832-840.
- Tao T, Del Valle A. Human oocyte and ovarian tissue cryopreservation and its application. *J Assist Reprod Genet* 2008;**25**:287-296.
- Taylor TH, Patrick JL, Gitlin SA, Wilson JM, Crain JL, Griffin DK. Comparison of aneuploidy, pregnancy and live birth rates between day 5 and day 6 blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2014;**29**:305-310.
- Terada Y, Ugajin T, Hasegawa H, Nabeshima H, Yaegashi N. Different embryonic development after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis, observed by time-lapse imaging. *Fertil Steril* 2009;**92**:1470-1471.
- Thomas MR, Sparks AE, Ryan GL, Van Voorhis BJ. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. *Fertil Steril* 2010;**94**:543-548.
- Thouas GA, Trounson AO, Wolvetang EJ, Jones GM. Mitochondrial dysfunction in mouse oocytes results in preimplantation embryo arrest in vitro. *Biol Reprod* 2004;**71**:1936-1942.

- Trokoudes KM, Pavlides C, Zhang X. Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. *Fertil Steril* 2011;**95**:1996-2000.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;**305**:707-709.
- Tsang WH, Chow KL. Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *BioTechniques* 2009;**46**:550-552.
- Ubaldi F, Anniballo R, Romano S, Baroni E, Albricci L, Colamaria S, Capalbo A, Sapienza F, Vajta G, Rienzi L. Cumulative ongoing pregnancy rate achieved with oocyte vitrification and cleavage stage transfer without embryo selection in a standard infertility program. *Hum Reprod* 2010;**25**:1199-1205.
- Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproductive BioMedicine Online* 2006;**12**:779-796.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta Vet Scand* 1997;**38**:349-352.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 2006;**65**:236-244.
- Valojerdi MR, Salehnia M. Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II (MII) mouse oocytes after slow freezing or vitrification. *J Assist Reprod Genet* 2005;**22**:119-127.
- Van den Abbeel E, Schneider U, Liu J, Agca Y, Critser JK, Van Steirteghem A. Osmotic responses and tolerance limits to changes in external osmolalities, and oolemma permeability characteristics, of human in vitro matured MII oocytes. *Hum Reprod* 2007;**22**:1959-1972.
- Van der Elst J, Van den Abbeel E, Jacobs R, Wisse E, Van Steirteghem A. Effect of 1,2-propanediol and dimethylsulphoxide on the meiotic spindle of the mouse oocyte. *Hum Reprod* 1988;**3**:960-967.
- Van Landuyt L, Verpoest W, Verheyen G, De Vos A, Van de Velde H, Liebaers I, Devroey P, Van den Abbeel E. Closed blastocyst vitrification of biopsied embryos: evaluation of 100 consecutive warming cycles. *Hum Reprod* 2011;**26**:316-322.
- Van Uem JF, Siebzehnruhl ER, Schuh B, Koch R, Trotnow S, Lang N. Birth after cryopreservation of unfertilized oocytes. *Lancet* 1987;**1**:752-753.
- Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaart V, Schoysman E. In vitro survival of metaphase II oocytes (MII) and blastocysts after vitrification in a hemi-straw (HS) system. *Fertil Steril* 2000;**74**.
- Veeck LL, Bodine R, Clarke RN, Berrios R, Libraro J, Moschini RM, Zaninovic N, Rosenwaks Z. High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts. *Fertil Steril* 2004;**82**:1418-1427.
- Vincent C, Garnier V, Heyman Y, Renard JP. Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes. *J Reprod Fertil* 1989;**87**:809-820.
- Visintin JA, Martins JF, Bevilacqua EM, Mello MR, Nicacio AC, Assumpcao ME. Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology* 2002;**57**:345-359.
- Walker MC, Murphy KE, Pan S, Yang Q, Wen SW. Adverse maternal outcomes in multifetal pregnancies. *BJOG* 2004;**111**:1294-1296.

BIBLIOGRAFÍA

- Wang S, Sun H. Blastocyst transfer ameliorates live birth rate compared with cleavage-stage embryos transfer in fresh in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection cycles: reviews and meta-analysis. *Yonsei Med J* 2014;**55**:815-825.
- Wang WH, Keefe DL. Spindle observation in living mammalian oocytes with the polarization microscope and its practical use. *Cloning Stem Cells* 2002;**4**:269-276.
- Wang XL, Zhang X, Qin YQ, Hao DY, Shi HR. Outcomes of day 3 embryo transfer with vitrification using Cryoleaf: a 3-year follow-up study. *J Assist Reprod Genet* 2012;**29**:883-889.
- Watson AJ, Damsky CH, Kidder GM. Differentiation of an epithelium: factors affecting the polarized distribution of Na⁺, K⁺-ATPase in mouse trophectoderm. *Dev Biol* 1990;**141**:104-114.
- Wei X, Xiangwei F, Guangbin Z, Jing X, Liang W, Ming D, Dianshuai Y, Mingxing Y, Jianhui T, Shien Z. Cytokeratin distribution and expression during the maturation of mouse germinal vesicle oocytes after vitrification. *Cryobiology* 2013;**66**:261-266.
- Whittingham DG. Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J Reprod Fertil* 1975;**43**:575-578.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 1972;**178**:411-414.
- Wilding M, Coppola G, Dale B, Di Matteo L. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction* 2009;**137**:619-624.
- Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001;**16**:909-917.
- Wilding M, De Placido G, De Matteo L, Marino M, Alviggi C, Dale B. Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertil Steril* 2003;**79**:340-346.
- Willadsen S, Polge C, Rowson L, Moor R. Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology* 11:560 1974;.
- Wilmut I, Rowson LE. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 1973;**92**:686-690.
- Wissing M:H, T., Mikkelsen A. Slower early embryo development in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) compared to regular cycling women (controls). *FertilSteril* 2012;**98**:S109.
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:1115-1121.
- Wright DL, Eroglu A, Toner M, Toth TL. Use of sugars in cryopreserving human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2004;**9**:179-186.
- Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 1982;**32**:399-403.
- Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum Reprod* 2009;**24**:797-804.

- Yoon TK, Lee DR, Cha SK, Chung HM, Lee WS, Cha KY. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2007;**88**:952-956.
- Yurttas P, Vitale AM, Fitzhenry RJ, Cohen-Gould L, Wu W, Gossen JA, Coonrod SA. Role for PADI6 and the cytoplasmic lattices in ribosomal storage in oocytes and translational control in the early mouse embryo. *Development* 2008;**135**:2627-2636.
- Zander-Fox D, Cashman KS, Lane M. The presence of 1 mM glycine in vitrification solutions protects oocyte mitochondrial homeostasis and improves blastocyst development. *J Assist Reprod Genet* 2013;**30**:107-116.
- Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 1984;**42**:293-296.
- Zeng M, Su S, Li L. Comparison of pregnancy outcomes after vitrification at the cleavage and blastocyst stage: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2018;**35**:127-134.
- Zhan Q, Ye Z, Clarke R, Rosenwaks Z, Zaninovic N. Direct Unequal Cleavages: Embryo Developmental Competence, Genetic Constitution and Clinical Outcome. *PLoS One* 2016;**11**:e0166398.
- Zhao XM, Ren JJ, Du WH, Hao HS, Wang D, Qin T, Liu Y, Zhu HB. Effect of vitrification on promoter CpG island methylation patterns and expression levels of DNA methyltransferase 1 α , histone acetyltransferase 1, and deacetylase 1 in metaphase II mouse oocytes. *Fertil Steril* 2013;**100**:256-261.
- Zheng X, Chen Y, Yan J, Wu Y, Zhuang X, Lin S, Zhu J, Lian Y, Qiao J, Liu P. Effect of repeated cryopreservation on human embryo developmental potential. *Reprod Biomed Online* 2017;**35**:627-632.

VIII. ANEXOS

ANEXO I: Publicaciones que comparan resultados entre ovocitos frescos y vitrificados.

Autor	Diseño del estudio	Dispositivo	Origen	Nº ciclos (Nºovocitos)	Tasa de supervivencia (%)	Tasa de fecundación (%)	Tasa de implantación (%)	Tasa de embarazo clínico (%)
Antinori et al. 2007	Cohortes	Cryotop Frescos	Propios Propios	120 (463) 251 (1029)	328/330 (99.4)	305/328 (93)	13.2	39/120 (32.5) 71/248 (28.6)
Cobo et al. 2008	Cohortes	Cryotop Frescos	Donados Donados	30 (231) 30 (219)	224/231 (96.9)	171/224 (76.3) 180/219 (82.2)	20/49 (40.8) 2/2 (100)	15/23 (65.2) 1/1 (100)
Nagy et al. 2009	Cohortes	Cryotop Frescos	Donados Donados	20 (153) 9 (182)	134/153 (89)	117/134 (87)	26/47 (55.3)	(75)
Cobo et al. 2010	Randomizado	Cryotop Frescos	Donados Donados	295 (3286) 289 (3185)	3039/3286 (92.5)	2256/3039 (74.2) 2334/3185 (73.3)	205/513 (39.9) 204/498 (40.9)	5/9 (55.6) 148/267 (55.4) 144/259 (55.6)
Rienzi et al. 2010	Randomizado sibling- oocytes	Cryotop Frescos	Propios Propios	40 (124) 40 (120)	120/124 (96.8)	95/120 (79.2) 100/120 (83.3)	19/93 (20.4)	15/39 (38.5) (43.2)
Almodin et al. 2010	Cohortes sibling- oocytes	Vitri-inga Frescos	Propios Propios	46 (252) 79 (413)	214/252 (84.9)	173/214 (80.8) 336/413 (81.4)	24/161 (14.9) 61/286 (21.3)	21/46 (45.6) 41/79 (51.9)
Ubaldi et al. 2010	Cohortes sibling- oocytes	Cryotop Frescos	Propios Propios	115 (487) 511 (173)	437/487 (89.7)	292/342 (85.4) 445/511 (87.1)	43/266 (16.1) 101/435 (23.2)	31.5 77/172 (44.8)
Trokoudes et al. 2011	Cohortes sibling- oocytes	Cryotop Frescos	Donados Donados	36 (210) 41 (247)	192/210 (91.4)	162/192 (84.4) 214/247 (86.6)	20/81 (24.7) 22/86 (25.6)	20/36 (55.6) 20/41 (48.8)
García et al. 2011	Randomizado	Cryolock Frescos	Donados Donados	34 (283) 85 (696)	253/283 (89.4)	191/251 (76.1) 608/695 (87.5)	43.9 42.9	61.8 60
Parmegiani et al. 2011	Cohortes sibling- oocytes	Cryotop + Frescos	Propios	31 (168) 31	151/168 (89.9)	107/126 (84.9) 106/120 (88.3)	13/76 (17.1)	11/31 (35.5) 4/30 (13.3)
Cobo et al. 2012	Cohortes	Cryotop Frescos	Propios Propios	384 (1192) 587 (1802)	1012/1192 (84.9)	1124/1701 (66.1) 1170/1802 (64.9)	110/440 (25) 138/540 (25.6)	(53.9) (57.7)
Forman et al. 2012	Randomizado	Cryotop Frescos	Propios Propios	(294) (294)	240/294 (81.6)	77.9 90.5		

Autor	Diseño del estudio	Dispositivo	Origen	Nº ciclos (Nºovocitos)	Tasa de Supervivencia (%)	Tasa de fecundación (%)	Tasa de implantación (%)	Tasa de embarazo clínico (%)
Chang et al. 2013	Randomizado sibling-oocytes	Cryotop	Propios	22 (186)	148/186 (79.6)	124/186 (66.6) ^a	16/53 (30.1)	10/22 (45.4)
		Frescos	Propios	22 (204)		153/204 (75)		
Solé et al. 2013	Randomizado sibling-oocytes	Cryotop	Donados	99	85.6	78.2	34	53.5
		Frescos	Donados	99		80.7	33.3	47.5
Siano et al. 2013	Cohortes sibling-oocytes	Cryotop	Propios	14 (83)	72/83 (86.7)	69.4	7/28 (25)	53.8
		Frescos		14 (81)		78.2		

ANEXO II: Relación de trabajos que utilizan ovocitos vitrificados en pacientes oncológicas.

	Sánchez Serrano et al. 2009	Kim et al. 2011	García-Velasco et al. 2013	Álvarez et al. 2014	Da Motta et al. 2014	Martínez et al. 2014	Perrin et al. 2016
Tipo de malignidad	Cáncer de mama	Leucemia mieloide crónica	Linfoma no-Hodking	Carcinoma ovárico invasivo	Cáncer de mama	Linfoma no-Hodking , Cáncer de mama	Linfoma de Hodking
Técnica de criopreservación	criopreservación de corteza ovárica + vitrificación ovocitos (Cryotop)	Vitrificación (EMG)	Vitrificación (Cryotop)	Vitrificación (Cryotop)	Vitrificación (Cryotip)	Vitrificación (Cryotop)	Vitrificación
Edad de PF	36	22	31	28	36	33/30/33/37	36
No. de ovocitos criopreservados	16	7	4	14	28	4/5/3/8	5
Tiempo de almacenaje (años)	2	9	2	1	6	2/3/5/3	2
Embarazo	Gemelar	Único	Único	Heterotopico	Triplete	Único (4)	Único
No. de niños nacidos	2	1	1	1	1	1 (4)	1
Semanas de gestación	34	35 + 3 días	39	38	A término	40/40/40/38	37,5
Peso	1650 y 1830	2410	3440	2650	2970	3440/2850/3220/ 2950	3180
Sexo	Niños	Niño	Niño	Niño	-	-/Niño/Niña/Niño	Niña

ANEXO III: Publicaciones originadas a partir de los resultados de esta tesis doctoral.

1.- Cobo A, **Coello A**, Remohi J, Serrano J, de Los Santos JM, Meseguer M. Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. *Fertil Steril* 2017;108:491-497.e3.

2.- Coello A, Meseguer M, Galan A, Alegre L, Remohi J, Cobo A. Analysis of the morphological dynamics of blastocysts after vitrification/warming: defining new predictive variables of implantation. *Fertil Steril* 2017;108:659-666.e4.